



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA AUTÓGENA DE MORAXELLA BOVIS NO
CONTROLO DA QUERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA EM BOVINOS DE
CARNE

FRANCISCO LADEIRA DE FIGUEIREDO E ROMÃO DE MOURA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Dr. Rui Jorge Batista Martelo

ORIENTADOR

Dr. Rui Jorge Batista Martelo

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA VACINA AUTÓGENA DE MORAXELLA BOVIS NO
CONTROLO DA QUERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA EM BOVINOS DE
CARNE

FRANCISCO LADEIRA DE FIGUEIREDO E ROMÃO DE MOURA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Dr. Rui Jorge Batista Martelo

ORIENTADOR

Dr. Rui Jorge Batista Martelo

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2017

LISBOA

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a toda a minha família, em especial a minha mãe e a meu pai, por todo o apoio durante esta importante aventura e por sempre me terem proporcionado as condições ideais para que eu pudesse realizar este sonho.

Ao Dr. Rui Martelo, meu orientador, por me ter aceitado como seu orientando, por todos os conhecimentos e experiências transmitidos e pela sua disponibilidade, companheirismo e amizade.

Ao Professor Doutor George Stilwell, meu co-orientador, por me ter aceitado como seu co-orientando e por todo o conhecimento partilhado e a sua disponibilidade.

Ao Dr. Telmo Nunes pela preciosa ajuda na análise estatística deste trabalho.

Ao Dr. Luís Miguel Bagulho Silva por ter aceitado que este estudo fosse feito nas suas explorações, sem a sua ajuda a realização deste trabalho não seria possível e à Enf.^a Rute Mourão pela preciosa ajuda na recolha e tratamento de dados.

Ao Professor Doutor Ricardo Romão por toda a disponibilidade e conhecimentos transmitidos e ao Dr. Diogo Paralta por tudo o que me ensinou e pela sua grande descontração e divertimento.

Às minhas amigas e colegas Inês e Ana, minhas companheiras de estágio, por toda a amizade e momentos de diversão vividos.

A todos os restantes elementos da VetAL, pela sua ajuda na integração da equipa durante todo o período de estágio.

A todos os meus amigos e colegas de curso, que foram dos principais responsáveis pelo sucesso durante este percurso académico.

A Deus, que sempre me ajudou, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Resumo – Avaliação da eficácia de uma vacina autógena de *Moraxella bovis* no controlo da queratoconjuntivite infecciosa bovina em bovinos de carne

A queratoconjuntivite infecciosa bovina (QIB) é a doença ocular primária mais comum em bovinos e, apesar de algumas vezes a taxa de morbilidade ser baixa, em surtos mais graves esta pode atingir valores muito altos. É com o intuito de avaliar a eficácia de uma vacina autógena de *Moraxella bovis* (*M. bovis*), no controlo desta doença, que este estudo foi desenvolvido.

O estudo foi desenvolvido entre os meses de Maio e Setembro de 2016 em duas explorações do distrito de Portalegre. Foram utilizados 126 animais, com idades compreendidas entre os cinco e os oito meses, os quais foram distribuídos aleatoriamente pelo grupo vacinal ou grupo controlo. Ao grupo vacinal foram administradas duas doses, por via subcutânea, da vacina autógena distanciadas em 21 a 26 dias e ao grupo controlo nada foi administrado. Como se tratavam de explorações comerciais, foi decidido que a proporção entre animais vacinados e controlo seria de 2:1. Os animais foram avaliados para a presença de lesões oculares durante o decorrer do estudo. Verificou-se que em ambas as explorações não existiam diferenças significativas entre os dois grupos.

Apesar deste resultado, o autor é da opinião que a vacina autógena tem efeitos positivos, uma vez que as lesões em animais vacinados eram de menor gravidade e resultaram em menos sequelas.

Palavras-chave: bovino; vacina; autógeno; *Moraxella bovis*; queratoconjuntivite infecciosa bovina.

Abstract – Evaluation of the effectiveness of a *Moraxella bovis* autogenous vaccine in the control of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef cattle

Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is the most common primary ocular disease in cattle, and although the morbidity rate is sometimes low, it can reach very high levels in more severe outbreaks. It is the aim of this study to evaluate the efficacy of a *Moraxella bovis* (*M. bovis*) autogenous vaccine in the control of this disease.

The study was carried out between May and September 2016 on two farms in the district of Portalegre. A total of 126 animals, aged between five and eight months, were randomly assigned to the vaccine or control group. Two vaccine doses were given subcutaneously to the vaccine group within 21 to 26 days, and the control group was given nothing. As these were commercial farms, it was decided that the ratio of vaccinated to control animals would be 2:1. The animals were evaluated for the presence of ocular lesions during the course of the study. It was found that in both farms there were no significant differences between the two groups.

Despite this result, the author is of the opinion that the autogenous vaccine has positive effects, since the lesions in vaccinated animals were of lower severity and resulted in fewer sequelae.

Keywords: bovine; vaccine; autogenous; *Moraxella bovis*; infectious bovine keratoconjunctivitis.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
Lista de símbolos.....	x
1 Actividades realizadas durante o estágio curricular	1
2 Queratoconjuntivite infecciosa bovina.....	3
2.1 Introdução	3
2.2 Anatomia do olho.....	3
2.3 Etiologia.....	6
2.4 Epidemiologia	7
2.4.1 Vectores	8
2.5 Patogénese	9
2.5.1 Fímbrias	10
2.5.2 Citotoxina	11
2.5.3 Fosfolipase B.....	12
2.5.4 Sistemas de captação de ferro	12
2.5.5 Hemaglutinina filamentosa.....	13
2.6 Sinais clínicos.....	13
2.7 Diagnóstico.....	17
2.7.1 Diagnóstico diferencial.....	17
2.7.2 Diagnóstico laboratorial	18
2.8 Tratamento	19
2.8.1 Tratamento tópico.....	19
2.8.2 Tratamento subconjuntival.....	20
2.8.3 Tratamento sistémico	20
2.9 Prevenção e controlo.....	21
3 Conceito de vacina e vacina autógena	22
3.1 Vacina	22
3.1.1 Tipos de imunização artificiais	23
3.1.2 Classificação geral das vacinas	24
3.1.3 Novos métodos de apresentação	26
3.2 Vacinas autógenas	26
3.2.1 Vacinas autógenas de uso veterinário	27
3.2.2 Utilização de vacinas autógenas.....	28

3.2.3	Recolha de amostras e produção de uma vacina de rebanho	28
4	Ensaio experimental	30
4.1	Objectivo	30
4.2	Materiais e métodos	30
4.2.1	Explorações.....	30
4.2.2	Amostra e data do estudo.....	31
4.2.3	Métodos estatísticos	32
4.3	Resultados	32
4.3.1	Exploração 1.....	33
4.3.2	Exploração 2.....	35
4.3.3	Geral	37
4.4	Discussão	40
4.5	Conclusão	44
5	Bibliografia.....	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Anatomia do olho. Fonte: Arnold & Lehmkuhler, 2012.	4
Figura 2 - Comparação do epitélio anterior de um canino (A) e de um ovino (B). Note-se o maior número de camadas que possui o epitélio do ovino. BC – células basais; WC – células poliédricas; SC – células escamosas. Fonte: Gelatt, Gilger & Kern, 2013.....	6
Figura 3 - Musca autumnalis (esquerda), Musca domestica (centro) e Stomoxys calcitrans (direita). Fonte: http://www.diptera.info/photogallery.php?album_id=29	8
Figura 4 - Um diplobacilo sem fímbrias (A) e um diplobacilo com fímbrias (B). Imagens recolhidas por microscopia electrónica de transmissão. Adaptado de Ruehl, Marrs, Fernandez, Falkow, & Schoolnik, 1988.....	11
Figura 5 - A epífora é um dos sinais iniciais característicos da QIB. Fonte: Alexander, 2010.	14
Figura 6 - Uma úlcera de córnea profunda que afecta o estroma. Pode-se observar edema difuso da córnea com vascularização desde o limbo em direcção ao centro da lesão. Fonte: Alexander, 2010.....	15
Figura 7 - Lesão de QIB em resolução. Pormenor da vascularização que atingiu o centro da lesão. Original.....	15
Figura 8 - Evolução de uma úlcera perforada num vitelo que sofria de QIB. As fotografias mostram um período de tempo de 77 dias, desde o primeiro dia em que a úlcera foi detectada. Embora a lesão tenha cicatrizado, o animal ficou permanentemente cego no olho afectado. Fonte: Angelos, 2015.....	16
Figura 9 - Olho após a aplicação de fluoresceína. Note-se o padrão do corante em que a área de fluoresceína no olho é continua com outra área corada na junção esclero-corneana. Este padrão é característico de úlceras associadas a corpos estranhos. Fonte: Angelos, 2015. .	18
Figura 10 - Edema como consequência de uma administração subconjuntival de oxitetraciclina. Fonte: Stilwell, 2016.	20
Figura 11 - Fotografia de satélite onde se podem observar os locais onde foi efectuado o estudo. A exploração E1 encontra-se do lado esquerdo e a exploração E2 encontra-se do lado direito. Adaptado de https://www.google.pt/maps	31
Figura 12 – Lesão de um animal presente na Exploração 1. Original.	33
Figura 13 - Identificação de novos casos de QIB na Exploração 1 ao longo do estudo.....	34
Figura 14 – Lesão de um animal presente na Exploração 2. Original.	36
Figura 15 - Identificação de novos casos de QIB na Exploração 2 ao longo do estudo.....	36
Figura 16 - Identificação de novos casos de QIB no conjunto das duas explorações ao longo do estudo.....	38
Figura 17 – Lesões observadas em dois animais no ano de 2015. Original.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Intervenções realizadas durante o estágio curricular, agrupadas por tipo de intervenção e espécie intervencionada. FA – frequência absoluta; FR – frequência relativa..	1
Tabela 2 – Comparação das vantagens entre vacinas inactivadas e atenuadas. Fonte: (Tizard, 2013).	25
Tabela 3 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo em E ₁ .	33
Tabela 4 - Resumo das medidas de associação entre os grupos vacinal e controlo para E ₁ .	34
Tabela 5 - Teste de significância para E ₁ .	35
Tabela 6 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo em E ₂ .	35
Tabela 7 – Resumo das medidas de associação entre grupos vacinal e controlo para E ₂ .	37
Tabela 8 - Teste de significância para E ₂ .	37
Tabela 9 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo no total das duas explorações.	37
Tabela 10 - Resumo das medidas de associação entre os grupos vacinal e controlo.	38
Tabela 11 - Teste de significância para os dados das duas explorações.	39

Lista de abreviaturas e siglas

BC – Células basais

E₁ – Exploração 1

E₂ – Exploração 2

FA – Frequência absoluta

FR – Frequência relativa

IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina

kg – Quilograma

mL - Mililitro

mg – Miligrama

M. bovis – *Moraxella bovis*

M. bovoculi – *Moraxella bovoculi*

M. autumnalis – *Musca autumnalis*

QIB – Queratoconjuntivite infecciosa bovina

SC – Células escamosas

WC – Células poliédricas

Lista de símbolos

% – Percentagem

1 Actividades realizadas durante o estágio curricular

O estágio curricular foi desenvolvido nas áreas de clínica de espécies pecuárias e equinos. Foi realizado no período compreendido entre 1 de Outubro de 2015 e 31 de Março de 2016, na VetAI – Clínica Veterinária do Alto Alentejo, em Portalegre, sob a orientação do Dr. Rui Martelo.

O objectivo principal deste estágio foi facultar ao orientando a aplicação e consolidação dos conhecimentos adquiridos previamente em contexto académico, através da execução de múltiplas tarefas relacionadas com a formação técnica obtida. Deste modo, prepara-se o orientando para as várias situações com que este se vai deparar no exercício da actividade como médico veterinário, nomeadamente no domínio da intervenção clínica e na aplicação dos planos sanitários e profilácticos. Para além disto, foi proporcionado contacto com experiências que não estão directamente ligadas à área clínica, sobretudo no que à burocracia diz respeito, mas que são igualmente fundamentais no exercício desta profissão.

A Tabela 1 sumariza o conjunto de intervenções realizadas por espécie e domínio de actuação. Os animais foram agrupados segundo a espécie (bovinos, pequenos ruminantes, suínos e equídeos) e segundo o domínio de intervenção (acção profiláctica, assistência reprodutiva e clínica/cirurgia). Na tabela os casos são apresentados em frequência absoluta, que traduz o número de casos totais, e em frequência relativa, que traduz a percentagem. O elevado número de intervenções na área da profilaxia, no caso dos bovinos e pequenos ruminantes, deve-se ao facto de quando se realizam os saneamentos anuais serem efectuadas as acções profilácticas obrigatórias, vacinação e desparasitação em simultâneo.

Tabela 1 – Intervenções realizadas durante o estágio curricular, agrupadas por tipo de intervenção e espécie intervencionada. FA – frequência absoluta; FR – frequência relativa.

Intervenção Espécie					
	Profilaxia	Assistência Reprodutiva	Clínica/Cirurgia	FA	FR
Bovinos	12980	272	95	13347	50%
Pequenos ruminantes	12535	246	54	12835	48.1%
Suínos	166	0	1	167	0.6%
Equídeos	106	102	126	334	1.3%
FA	25787	620	276	26683	100%
FR	96.6%	2.3%	1.1%	100%	

No que à profilaxia diz respeito, são consideradas as intervenções obrigatórias e as acções profilácticas facultativas, como vacinação e desparasitação. As intervenções obrigatórias consistem no saneamento anual obrigatório, que inclui o rastreio de brucelose e tuberculose em bovinos e o rastreio de brucelose em pequenos ruminantes. As intervenções facultativas consistem nas vacinações e desparasitações de carácter opcional, requisitadas pelos produtores.

No domínio da assistência reprodutiva as acções realizadas incluíram diagnóstico de gestação, sincronização de estros, exames andrológicos e inseminação artificial.

Na área da clínica e cirurgia foram acompanhados vários casos nas várias espécies consideradas. Em bovinos, foram registados casos das áreas de neonatologia, aparelho reprodutor, sistema musculo-esquelético, aparelho digestivo, aparelho respiratório e outros procedimentos como necrópsia e eutanásia. Em pequenos ruminantes, os casos acompanhados eram sobretudo das áreas do aparelho digestivo, aparelho reprodutor e outros procedimentos como necrópsia, eutanásia e descorna. Em equídeos, as áreas exploradas foram a odontologia, aparelho reprodutor, aparelho locomotor, aparelho digestivo e alguns casos em particular como uma intoxicação por planta num asinino, um caso de Herpes vírus tipo 2 em equino, um caso de Vírus do West Nile em equino e o diagnóstico de um poldro com o Síndrome do poldro lavanda. Em suínos apenas foi realizada necrópsia em um animal.

2 Queratoconjuntivite infecciosa bovina

2.1 Introdução

Os primeiros relatos de casos de queratoconjuntivite infecciosa bovina (QIB) remontam ao ano de 1889 (Brown, Brightman, Fenwick, & Rider, 1998), sendo hoje em dia considerada a doença ocular primária mais comum em bovinos. O agente etiológico da QIB é a bactéria Gram negativa *M. bovis*, embora outros agentes também possam estar envolvidos nesta doença (Postma, Carfagnini, & Minatel, 2008; Angelos, 2015).

A severidade dos casos vai desde pequenas lesões com raros sinais clínicos até casos onde há edema conjuntival substancial, ulceração da córnea e posterior opacidade da mesma. Apesar da taxa de mortalidade ser muito baixa ou até nula, esta doença pode ter uma alta taxa de morbilidade, podendo conduzir a importantes perdas económicas relacionadas com o tratamento e perdas de produção (Postma et al., 2008), para além de poder ter um grande impacto sobre o bem-estar animal.

A vacinação é uma hipótese na prevenção da QIB. No entanto, em Portugal não existe vacina comercial disponível. Isto pode ser explicado pela variedade de serótipos que *M. bovis* tem, não havendo imunidade cruzada entre eles. Sendo assim, a produção e utilização de uma vacina autógena de rebanho será uma opção na prevenção da doença. É no sentido de esclarecer a eficácia desta estratégia em animais em extensivo, que foi feito o estudo experimental deste trabalho.

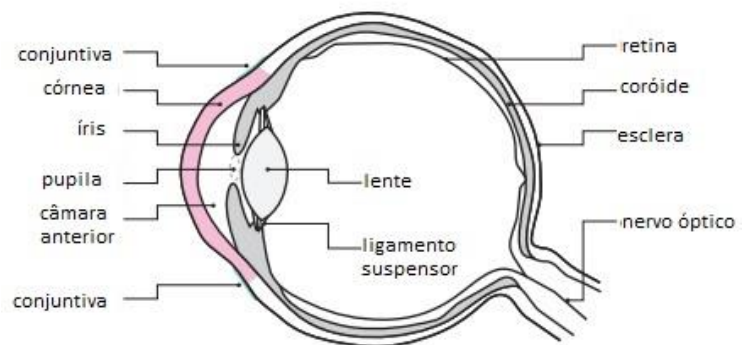
Em seguida, é feita uma revisão teórica sobre a QIB e sobre os conceitos de vacina e vacina autógena.

2.2 Anatomia do olho

O órgão visual dos bovinos é formado pelo globo ocular (Figura 1) e as suas estruturas acessórias: pálpebras, conjuntiva, aparelho lacrimal e muscular, periórbita e fáscia bulbar. O olho está alojado na órbita que é formada pelos ossos frontal, lacrimal, zigomático, esfenóide e temporal (Gloobe, 1989). Os olhos dos bovinos situam-se numa posição lateral (como é característica de espécies presa) e destacam-se além da margem da órbita. Com a ajuda dos movimentos oculares, estes têm um campo de visão de aproximadamente 360 graus. No entanto, esta condição não permite uma boa visão tridimensional, resultante da combinação das imagens colhidas pelos dois olhos formando uma só imagem a nível cerebral (Getty, 1986).

Na prática médico-veterinária o olho e os seus anexos apresentam uma grande variedade de patologias, sendo a QIB a mais comum em bovinos (Angelos, 2015). É importante que o médico-veterinário faça um bom exame da mucosa conjuntival, pupila, fundo do olho e reflexos quando suspeita de alguma patologia do órgão da

Figura 1 - Anatomia do olho. Fonte: Arnold & Lehmkuhler, 2012.



visão. A inspecção da conjuntiva tem uma especial importância como prática sistemática, uma vez que esta é muito sensível e reage a influências externas ou internas com variações na sua coloração (Gloobe, 1989).

A conjuntiva é a membrana mucosa mais exposta a agressões e tem como principais funções prevenir a dessecação da córnea, aumentar a mobilidade das pálpebras e globo ocular e providenciar uma barreira física e fisiológica contra microorganismos e corpos estranhos. Anatomicamente está dividida em duas partes: palpebral e bulbar. A conjuntiva palpebral é a membrana mucosa que reveste a porção posterior das pálpebras, enquanto a porção bulbar é aquela que reveste o globo ocular e é contígua com o epitélio corneal. A junção entre as partes palpebral e bulbar é designada fórnix. Ventralmente, uma prega adicional é formada pela reflexão da conjuntiva sobre a membrana nictitante, o saco conjuntival (Gelatt, Gilger, & Kern, 2013). A conjuntiva é uma estrutura anatómica muito importante na QIB, pois é nela que o processo patológico se inicia e é normalmente a principal afectada.

A córnea é a túnica fibrosa e transparente mais anterior do globo ocular. As suas funções são o suporte dos conteúdos intraoculares, a refacção da luz (dada a sua curvatura) e a transmissão de luz. Como uma lente, a córnea é transparente, avascular e permite a refacção da luz. Esta estrutura depende do humor aquoso e das lágrimas para a sua nutrição e limpeza, e das pálpebras e membrana nictitante para protecção das agressões ambientais (Gelatt et al., 2013).

A córnea tem uma forma elíptica, com um diâmetro horizontal maior do que o vertical. Na maioria dos ungulados, esta diferença é muito mais pronunciada, o que permite que tenham um campo visual horizontal notável. A combinação das dimensões exageradas da córnea e a posição lateral do globo ocular é uma característica que lhes garante protecção contra os predadores (Gelatt et al., 2013).

Histologicamente, a córnea é composta por quatro camadas (da mais anterior para a mais posterior): epitélio anterior, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Gelatt et al., 2013).

O epitélio da córnea é a camada mais superficial, sendo do tipo escamoso estratificado não queratinizado. É bastante mais espessa nos ungulados domésticos do que nos carnívoros, como mostra a Figura 2 (Gelatt et al., 2013).

O estroma corneal compreende cerca de 90% da espessura da córnea e é constituído por lâminas transparentes de tecido fibroso sem estrutura que se organizam em lâminas. Entre estas lâminas existem células fixas e raras que são os fibrócitos que contribuem para a formação e manutenção das lâminas do estroma. Estas células podem voltar à actividade como fibroblastos quando existe uma lesão profunda da córnea e formar tecido cicatricial (Gelatt et al., 2013).

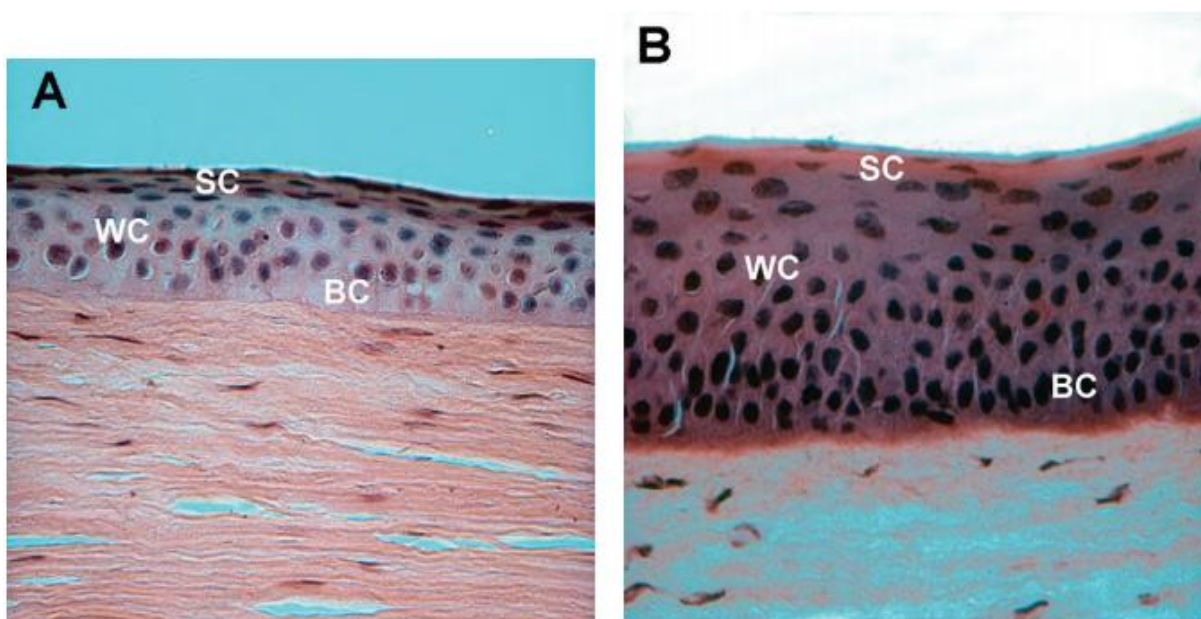
A membrana de Descemet é uma membrana homogénea e acelular que forma uma camada interior protectora da córnea. É produzida pelo endotélio posterior durante a vida de um animal. Funciona como barreira protectora contra as lesões oculares e infecção e tem capacidade de regeneração após agressão (Gelatt et al., 2013).

O endotélio é uma camada única de células achatadas que delineam o interior da córnea. Existe alguma controvérsia em relação à capacidade de regeneração desta estrutura, e sabe-se que pode variar com a espécie e idade. Em animais adultos a mitose das células endoteliais é lenta e escassa e quando ocorre perda de células, aquelas que restam ocupam o espaço da lesão. O endotélio tem um papel de relevo, pois mantém a transparência e a organização das camadas da córnea, evitando edema corneal (Gelatt et al., 2013).

No que toca à reparação da córnea, estão envolvidos dois processos: a migração de células para ocupar a área lesionada e a mitose para reconstituir o número normal de células epiteliais. A migração ocorre imediatamente a seguir à agressão corneal. A divisão celular depressa se segue de maneira a repor a espessura normal do epitélio. Quando as lesões são pequenas estas podem ser reparadas pela migração celular, no entanto, quando as lesões já são mais extensas já é necessária a divisão celular.

A observação de vasos sanguíneos no centro da córnea, em vez de perifericamente, é sinónimo de doença. Estes apenas são observados em situação não patológica em espécies de animais que não as domésticas (Gelatt et al., 2013). É o que acontece no caso da QIB, em que no processo de cicatrização há a neovascularização da córnea lesada.

Figura 2 - Comparação do epitélio anterior de um canino (A) e de um ovino (B). Note-se o maior número de camadas que possui o epitélio do ovino. BC – células basais; WC – células poliédricas; SC – células escamosas. Fonte: Gelatt, Gilger & Kern, 2013.



2.3 Etiologia

M. bovis é um diplobacilo gram-negativo, aeróbico, oxidase positivo, não fermentador de açúcares e que é geralmente implicado como agente etiológico da QIB por ser o mais comumente isolado de bovinos com sinais clínicos. Morfologicamente, as colônias de *M. bovis* são classificadas como lisas ou rugosas (Brown et al., 1998; Coetzer, 2004). Infecções experimentais em vitelos e estudos em tecido corneal em cultura mostram uma grande variação da virulência entre diferentes estirpes. Os factores de virulência são β -hemolisinas, fímbrias, leucotoxinas e proteases (Radostists, 2007). As estirpes patogénicas são hemolíticas ou com fímbrias. Foram identificados sete serotipos diferentes, cada um associado a um tipo de fímbria (A-G). Estas vão mediar a adesão bacteriana à córnea e o estabelecimento de infecção, evitando a remoção do agente pelas secreções oculares e a acção mecânica do blefarospasmo. Cada serotipo está associado à produção de anticorpos específicos (Coetzer, 2004; Radostists, 2007). A β -hemolisina é citotóxica e produz danos profundos na córnea. Também as proteases têm um papel importante na virulência da bactéria *M. bovis* (Coetzer, 2004).

Na literatura existem vários agentes associados a casos de QIB sem ser *M. bovis*. Na longa lista de estudos relacionados com a doença durante vários anos, foram isoladas outras bactérias de animais com sinais clínicos de QIB que não se enquadravam na morfologia de *M. bovis*. A maior parte destes organismos eram identificados como *Neisseria spp* que eram na realidade formas cocoides de *Moraxella*. Um desses organismos era *Neisseria ovis* (posteriormente designado *Moraxella ovis*) que foi isolado em vários animais (Angelos, 2010). No entanto, em estudos em que os animais foram experimentalmente infectados com este

agente, não houve o desenvolvimento de lesões típicas de QIB (Pedersen, 1972; Elad, Yeruham, & Bernstein, 1988). Mais recentemente foi descrito outro *coccus* gram negativo, hemolítico, como *Moraxella bovoculi* (*M. bovoculi*), que provavelmente sempre circulou nas populações de bovinos e seria identificado como *Neisseria spp.* No entanto, ainda não se conseguiu precisar qual o papel de *M. bovoculi* na patogénese da QIB e nenhum estudo identificou este agente como causal da doença (Angelos, 2010; Gould et al., 2013).

Infecções por *Mycoplasma spp.* também têm uma elevada prevalência na conjuntiva de animais com QIB. No entanto, um estudo recente levado a cabo por Schnee, Heller, Schubert, & Sachse (2015), não conseguiu provar a associação causal entre *Mycoplasma bovoculi* e a ocorrência de QIB. De qualquer maneira, este estudo reforça a ideia de que este agente pode ter um papel importante como factor predisponente da doença, abrindo o caminho para a infecção por *M. bovis* e o desenrolar da doença clínica. Também num estudo realizado em Portugal por Simões (2008) foi feita a pesquisa de *Mycoplasma* e *Chlamydia* em animais que apresentavam lesões de QIB, sendo todas as amostras negativas para estas bactérias.

O vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) também poderá estar associado à QIB predispondo para a infecção bacteriana, mas poderá causar doença ocular por si só, sendo importante a distinção entre os dois casos (Brown et al., 1998).

Como as infecções que ocorrem naturalmente são mais graves do que aquelas que são induzidas experimentalmente, existem provavelmente outros factores não infecciosos que se devem ter em conta (Radostists, 2007).

2.4 Epidemiologia

Esta doença é altamente contagiosa e está presente na maior parte dos países a nível mundial. Apesar de poder ocorrer em qualquer altura do ano, é mais frequente na Primavera, Verão e Outono (Radostists, 2007). Os surtos de QIB estão associados a níveis de radiação UV muito altos (Hughes & Pugh, 1970; Smith & Blakenship, 1990; Senturk, Cetinf, Temizel, & Ozel, 2007) e ocorrem, principalmente, no Verão. A prevalência e gravidade da doença varia bastante de ano para ano e pode chegar a ter proporções epizoóticas em *feedlots* (Radostists, 2007).

Apenas os bovinos são afectados, sendo mais comum nos animais jovens. Não obstante, esta doença pode atingir um animal de qualquer idade (Radostists, 2007). A mortalidade é praticamente nula e os casos em que há perda completa da visão ou há destruição de um olho, são raros. No entanto, a morbilidade pode chegar a valores tão altos como 80%. Surtos durante o Inverno também podem acontecer, sobretudo se os animais estiverem confinados a estábulos ou *feedlots* (Radostists, 2007).

Num estudo conduzido por Snowden, Vleck, Cundiff e Bennett (2005), que avaliou retrospectivamente registos de 45 497 animais durante um período de vinte anos, foram avaliados factores genéticos e ambientais na incidência de QIB. Os autores concluíram que a

raça Hereford é a mais afectada, com uma média superior em mais de três vezes em relação à média de todas as raças estudadas. Este valor foi justificado com a ausência ou diminuição da pigmentação das pálpebras. As raças com maiores incidências, a seguir à Hereford, foram a Simmental e Charolesa. Os animais que apresentaram menores incidências foram aqueles que resultavam do cruzamento de *Bos taurus* e *Bos indicus*, sugerindo que os animais pertencentes a esta última espécie sejam mais resistentes a QIB. No que aos factores ambientais diz respeito, este estudo mostrou que a incidência da doença variou durante os vários anos, no entanto o seu pico observou-se, normalmente, nos meses de Julho e Agosto. Neste estudo foi concluído ainda que a idade do vitelo também tem influência, sendo a doença mais comum em animais com menos de trinta dias.

Os bovinos são o reservatório do agente sendo que este permanece na conjuntiva, narinas e vagina dos animais. A persistência da doença de um ano para outro acontece através de animais infectados, que podem actuar como portadores por períodos que podem exceder um ano (Radostists, 2007). A transmissão dá-se pelo contacto destes agentes contaminados com descargas oculares e nasais de animais infectados. Em situação experimental, a transmissão é rara na ausência de moscas, sendo a *Musca autumnalis* considerada o vector mais importante desta doença.

2.4.1 Vectores

A bactéria *M. bovis* é transmitida por contacto directo, nasal, por descargas oculares e vectores mecânicos. O vector mais importante a considerar é a mosca da face (*M. autumnalis*), Figura 3. A mosca doméstica (*Musca domestica*) e a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*), Figura 3, também podem funcionar como vectores, mas em ocasiões mais raras (Brown et al., 1998).

Figura 3 - *Musca autumnalis* (esquerda), *Musca domestica* (centro) e *Stomoxys calcitrans* (direita).
Fonte: http://www.diptera.info/photogallery.php?album_id=29



A *M. autumnalis* encontra-se sobretudo na cabeça de vacas e cavalos e aí permanecem durante curtos períodos de tempo. Este insecto utiliza um aparelho bucal abrasivo para estimular a produção de secreções oculares, das quais se alimenta. Para além disso, também se alimenta de descargas nasais, saliva ou sangue presente em feridas. A maior parte do

tempo estas moscas não se encontram nos animais, repousando em vedações, plantas ou outros objectos (Brown et al., 1998; Townsend, 2014).

A mosca da face deposita os seus ovos em fezes de bovino frescas e as larvas transformam-se em pupas quando as fezes estão secas ou no solo adjacente. As moscas adultas em estado pre-reprodutivo entram em hipobiose em zonas abrigadas durante o Inverno, como celeiros ou outros edifícios. Estas tornam-se activas novamente na Primavera ou quando existe um período de temperaturas amenas. É nesta altura que dão início à sua época reprodutiva. As fêmeas depois de acasalarem dispersam-se pelo ambiente e dão início à vitelogénese. Segundo Krafur & Moon (1997) a data da primeira postura de ovos depende do número de dias em que a temperatura é superior a 12°C desde o dia 1 de Janeiro de cada ano. Desde a vitelogénese até à postura passam, em média, 7 dias. Após a postura dos ovos em fezes, o desenvolvimento até adulto demora, em média, 14 dias e também é influenciado pelos registos de temperatura.

O pico de abundância desta mosca dá-se normalmente no meio ou fim do Verão, quando começa o final da época de reprodução. Como já foi dito, esta espécie de mosca actua como vector mecânico de *M. bovis*, que pode sobreviver até três dias nas patas do insecto (Bowman, 2010; Townsend, 2014). A incidência de QIB num efectivo varia consideravelmente de ano para ano e é normalmente maior durante a época em que existem moscas (Townsend, 2014). Prova da relação entre a QIB e a *M. autumnalis* é o facto de a prevalência desta doença ter aumentado desde que esta espécie de mosca chegou ao continente Norte Americano (Krafur & Moon, 1997). Gerhardt, Allen, Greene, & Smith (1982) também verificaram que animais protegidos contra esta mosca manifestavam menos QIB e havia uma menor quantidade de estirpes hemolíticas isoladas de *M. bovis* em comparação com animais que não receberam nenhuma protecção. Este estudo também concluiu que não é necessário o contacto directo entre animais para haver a dispersão da doença entre manadas e confirmou que a dispersão de *M. bovis* entre manadas começava quando as populações de *M. autumnalis* excediam 10 por animal durante 1 mês.

2.5 Patogénese

A maior parte dos estudos publicados sobre a patogénese de *M. bovis* realçam o papel das proteínas que permitem que este microorganismo adira à córnea e cause dano no epitélio corneal. As proteínas de adesão que melhor estão caracterizadas são as fímbrias, presentes na superfície da bactéria. Os danos que posteriormente são causados são atribuídos à acção de uma citotoxina β -hemolítica, corneotóxica e leucotóxica. Já foi provado que estes dois factores de virulência têm um papel na patogénese de *M. bovis*, no entanto esta bactéria produz várias enzimas que, apesar de não ter sido directamente provado que estão envolvidas na sua patogénese, podem ter alguma influência no desenvolvimento de QIB.

É provável que existam outras proteínas, para além das fímbrias, que tenham um papel importante na patogénese de *M. bovis*. Já foi mostrado que algumas estirpes sem fímbrias conseguem aderir, mesmo que seja com menos eficiência, a vários tipos de células, sugerindo que tenham um papel na adesão celular (Angelos, 2010). Neste grupo estão incluídas fosfolipases, enzimas hidrolíticas e proteolíticas e sistemas de captação de ferro (Postma et al., 2008; Angelos, 2010). Várias proteínas de *M. bovis*, para além das fímbrias, podem estar envolvidas na adesão à córnea. Nestas proteínas está incluída uma hemaglutinina filamentosa (Kakuda, Sarataphan, Tanaka, & Takai, 2006). Como vai ser discutido mais à frente, uma fosfolipase e proteínas envolvidas na captação de ferro também foram identificadas em *M. bovis* e podem ter um papel importante na sua patogénese (Angelos, 2010).

Em seguida vão ser analisados em pormenor os dois factores de virulência que se sabe estarem envolvidos na patogénese desta bactéria, bem como as enzimas que também podem ter um papel no desenvolvimento de QIB.

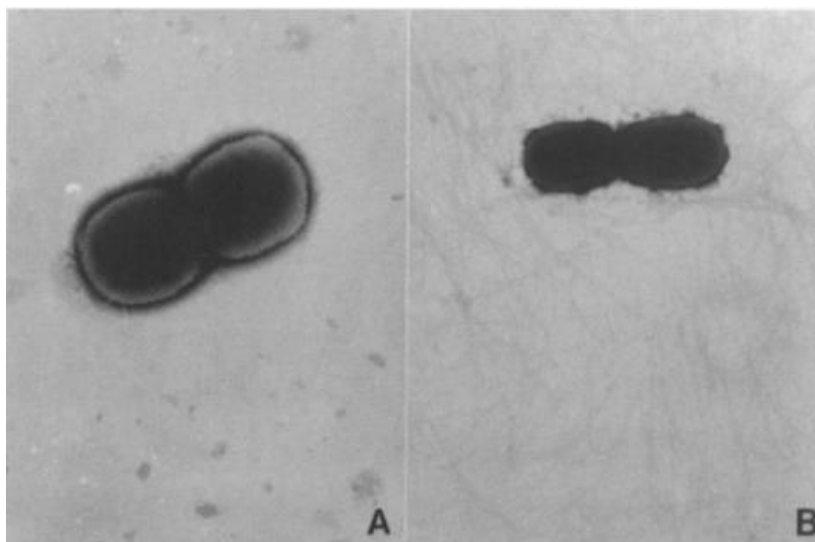
2.5.1 Fímbrias

Uma característica fundamental na patogénese de *M. bovis* é a expressão de fímbrias (Figura 4), que são projecções na superfície da célula compostas por subunidades individuais de pilina (Angelos, 2010). As fímbrias são muito importantes no estabelecimento de doença, pois apenas as estirpes que as apresentam são capazes de provocar doença com sinais clínicos de QIB (Postma et al., 2008). Quando em laboratório se fazem passagens por meio de cultura de *M. bovis* com fímbrias, muitas vezes esta deixa de as produzir dando origem a estirpes “lisas” (Angelos, 2010). A importância das fímbrias na patogénese de *M. bovis* também já foi demonstrada *in vivo* por Jayappa & Lehr (1986) quando inocularam a mesma estirpe da bactéria que diferia entre culturas com fímbrias e sem fímbrias. Os autores concluíram que as culturas que apresentavam fímbrias induziam queratoconjuntivite clínica, enquanto as culturas sem fímbrias não induziram qualquer tipo de doença. Neste estudo também foi avaliada a eficácia de vacinas contra as diferentes culturas, indicando que os animais que foram imunizados com a vacina preparada a partir de culturas com fímbrias mostraram lesões significativamente menos graves do que os animais controlo ou imunizados com vacina preparada a partir de culturas sem fímbrias.

Moore & Lepper (1991) desenvolveram um estudo em que utilizou o teste ELISA, que permitiu dividir as fímbrias em sete serogrupos diferentes, denominando-os de A a G. É muito provável que as diferentes eficácias observadas na vacinação contra *M. bovis* estejam relacionadas com esta variedade de serotipos, pois a estirpe presente na vacina pode não ser idêntica àquela que afecta os animais. Para além disso, também os tipos de fímbrias podem ser diferentes, sendo classificados em I e Q. Verificou-se que as fímbrias Q são importantes na colonização da córnea dos animais, enquanto as do tipo I estão envolvidas na manutenção da infecção (Angelos, 2010). As estirpes que apresentam fímbrias Q são geralmente mais

eficientes a estabelecer a infecção e mais patogénicas do que as estirpes com fímbrias I (Postma et al., 2008).

Figura 4 - Um diplobacilo sem fímbrias (A) e um diplobacilo com fímbrias (B). Imagens recolhidas por microscopia electrónica de transmissão. Adaptado de Ruehl, Marrs, Fernandez, Falkow, & Schoolnik, 1988.



2.5.2 Citotoxina

Para além das fímbrias que são necessárias para a adesão da bactéria, a patogénese de *M. bovis* também depende da expressão de uma citotoxina que tem propriedades hemolíticas, corneotóxicas e leucotóxicas (Kagonyera, L., & M., 1989; Høien-Dalen, Rosenbusch, & Roth, 1990; Beard & Moore, 1994; Gray, Fedorka-Cray, & Rogers, 1995). As estirpes não-hemolíticas de *M. bovis* não são patogénicas para os bovinos. A importância da hemolisina como factor de virulência foi demonstrada por Beard & Moore (1994) ao injectar intracornealmente uma fracção hemolítica de uma estirpe patogénica de *M. bovis*, resultando em lesões de córnea muito semelhantes às que ocorriam em casos não induzidos de QIB. As fracções equivalentes não-hemolíticas não causaram lesões oculares. Em agar sangue, as colónias hemolíticas de *M. bovis* produzem um halo de hemólise à sua volta. Quando eritrócitos são expostos à citotoxina produzida por esta bactéria ocorre lise dos mesmos (Angelos, 2010).

As estirpes hemolíticas de *M. bovis* produzem uma citotoxina formadora de poros que promove o desenvolvimento de úlceras corneais pela lise de células epiteliais da córnea e de neutrófilos *in vitro*, resultando numa extensa libertação de enzimas neutrofílicas com a consequente fragmentação e agregação de fibrilas de colagénio em estados mais avançados que atrasam a cicatrização da córnea (Postma et al., 2008).

Ostle & Rosenbusch (1985) estudaram a actividade contra a hemolisina de *M. bovis* em 35 bovinos. Todos estes animais, afectados naturalmente com a doença, seroconverteram a

respeito da antihemolisina, quer estivessem afectados clinicamente com QIB ou não. A actividade antihemolisina foi registada até sete anos depois de os animais estarem afectados clinicamente com QIB. O soro de vitelos que foram infectados experimentalmente possuía actividade antihemolítica contra as 33 estirpes de *M. bovis* que foram testadas. Com este estudo é possível verificar que a citotoxina que *M. bovis* possui é um factor muito importante na sua patogénese, bem como pode ser um antigénio adequado para utilização em vacinas que induzam protecção contra várias estirpes desta bactéria.

Como já foi dito, as estirpes hemolíticas de *M. bovis* são patogénicas e as estirpes não-hemolíticas não são consideradas patogénicas. No entanto, não se sabe ao certo o papel das estirpes não hemolíticas em infecções naturais. Já foram isoladas estirpes não-hemolíticas de animais assintomáticos, de animais que exibiam conjuntivite e de animais em que também foram isoladas estirpes hemolíticas que exibiam QIB (Angelos, 2010).

Um estudo conduzido por George, Borrowman, & Angelos, (2005) avaliou a eficácia de uma vacina produzida com base na citolisina de *M. bovis* num grupo de vitelos em que a incidência anual de QIB excedia os 50%. Os autores concluíram que os efeitos positivos da vacina incluíam menos animais afectados, úlceras de córnea menores, estado clínico menos grave aquando da primeira observação e uma velocidade de estabelecimento da doença 2.5 vezes menor. Sendo assim, uma vacina com base na citolisina produzida por *M. bovis*, pode conferir protecção contra infecções de QIB que ocorrem naturalmente.

2.5.3 Fosfolipase B

Farn, Strugnell, Hoyne, Michalski, & Tennent, (2001) descreveram uma proteína com actividade como fosfolipase B em *M. bovis*. A actividade enzimática desta fosfolipase B nos fosfolípidos de membrana pode resultar em lise celular e conduzir aos danos na córnea que se observam na QIB. As fosfolipases são reconhecidas como um factor de virulência determinante em algumas espécies de bactéria, tais como *Listeria sp.* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. No entanto, ainda não foi provado que esta enzima tenha um papel na patogénese desta bactéria. Sendo assim, esta poderia ser um antigénio a incluir numa vacina contra QIB.

2.5.4 Sistemas de captação de ferro

O ferro é um elemento essencial para a maior parte dos organismos vivos, pois funciona como cofactor em muitas proteínas chave, tais como: citocromos, oxidases, catalases e ribonucleotido redutase. Nos mamíferos, a maior parte do ferro encontra-se intracelularmente na forma de hemoglobina. As proteínas transportadoras de ferro transferrina e lactoferrina sequestram as pequenas quantidades de ferro extracelular. Esta acção diminui a concentração de ferro livre aquoso para níveis abaixo daqueles necessários para o crescimento bacteriano (Yu & Schryvers, 2002).

De maneira a ultrapassar as condições de restrição de ferro do hospedeiro, as bactérias desenvolveram sistemas de sequestro de ferro de alta afinidade que são capazes de captar ferro das transferrina e lactoferrina. O mecanismo envolve a síntese e secreção de pequenas moléculas quelantes de ferro, os sideróforos (Yu & Schryvers, 2002).

M. bovis é capaz de remover ferro directamente das transferrina e lactoferrina bovinas através de receptores de superfície específicos. A expressão destes receptores foi particularmente aumentada quando o crescimento desta bactéria ocorreu em condições limitadas de ferro (Postma et al., 2008).

As proteínas do receptor de lactoferrina são alvos atractivos para a utilização em vacinas, uma vez que estão presentes em todos os isolados bacterianos e estão acessíveis na superfície celular como consequência da sua função. Porém, a heterogenicidade genética e antigénica desta proteína terá que ser tida em conta. Neste momento não há dados suficientes que avaliem a potencial eficácia das proteínas captadoras de lactoferrina de *M. bovis* como antigénio em vacinas contra a QIB (Yu & Schryvers, 2002).

2.5.5 Hemaglutinina filamentosa

Kakuda et al. (2006) reportaram a existência de duas sequências, presentes num plasmídeo, que codificam proteínas que têm homologia com a hemaglutinina filamentosa. Esta proteína permite a esta bactéria a adesão à superfície de mucosas. Apesar de estes homólogos da hemaglutinina filamentosa não terem sido detectados a nível proteico, a conservação dos genes e a sua distribuição por vários isolados clínicos sugerem que estes genes e os seus produtos podem de alguma maneira influenciar a virulência de *M. bovis*. No entanto, para a confirmação destas suposições seria necessário o estudo de mutantes com deleção destes genes e a sua acção em animais.

2.6 Sinais clínicos

Os sinais clínicos e a progressão da doença variam de animal para animal (Stokka, Davidson, & Van Boening, 2000), sabendo-se que é normal os animais mais jovens sofrerem um processo mais grave (Gelatt et al., 2013). Um período de incubação de dois a três dias é considerado normal, apesar de terem sido observados experimentalmente intervalos maiores, de até três semanas (Radostists, 2007). Os animais afectados mostram inapetência e prostração. Frequentemente, apenas um olho está afectado no início da doença, no entanto, a infecção cruzada para o outro olho pode acontecer. A visualização de vasos da córnea e edema da conjuntiva são os sinais iniciais, sendo acompanhados por um lacrimejamento abundante (Figura 5), vários graus de blefarospasmo, fotofobia e, em alguns casos, uma febre leve a moderada com queda da produção leiteira e inapetência (Brown et al., 1998; Stokka et al., 2000; Crispin, 2005; Radostists, 2007; Gelatt et al., 2013). O corrimento que, primariamente, é aquoso rapidamente se torna purulento (Postma et al., 2008). As lesões

iniciais de QIB podem ser difíceis de identificar e o reconhecimento de outros sinais clínicos como o lacrimejamento, epífora, blefarospasmo e fotofobia podem ajudar no diagnóstico da doença (Angelos, 2015). A falha na observação cuidada e de perto dos animais atrasa o diagnóstico nesta fase da doença, o que pode acontecer facilmente dado o tamanho bastante pequeno das lesões iniciais (Brown et al., 1998; Gelatt et al., 2013; Angelos, 2015).

Em um a dois dias, começa a aparecer uma pequena opacidade no centro da córnea que se pode tornar elevada e ulcerar nos dois dias seguintes (Crispin, 2005; Radostists, 2007) ou até duas semanas depois (Brown et al., 1998), apesar de a cura espontânea ser muito comum nesta fase (Radostists, 2007). Com a progressão da doença, o tamanho das úlceras de córnea aumenta e pode chegar até a um diâmetro de 25 mm, com a consequente perda de integridade do estroma corneal (Brown et al., 1998; Radostists, 2007). É nesta altura que o olho se encontra mais sensível e doloroso (Stokka et al., 2000). A lesão epitelial leva à entrada de fluído para o estroma da córnea, resultando em edema da córnea. Conforme a doença progride, desenvolve-se uma conjuntivite que

pode ter vários graus de severidade. Os vasos conjuntivais encontram-se dilatados e desenvolvem-se quemose e hiperémia que podem ir de suaves a moderadas. Normalmente as pálpebras também estão afectadas, apresentando edema generalizado e blefarite (Brown et al., 1998; Gelatt, Gilger, & Kern, 2013). A opacidade aumenta consideravelmente de tamanho e no pico do processo inflamatório, após seis dias do aparecimento dos primeiros sinais clínicos, esta pode recobrir toda a córnea (Radostists, 2007). Alexander (2010) faz referência a um animal que

Figura 5 - A epífora é um dos sinais iniciais característicos da QIB. Fonte: Alexander, 2010.



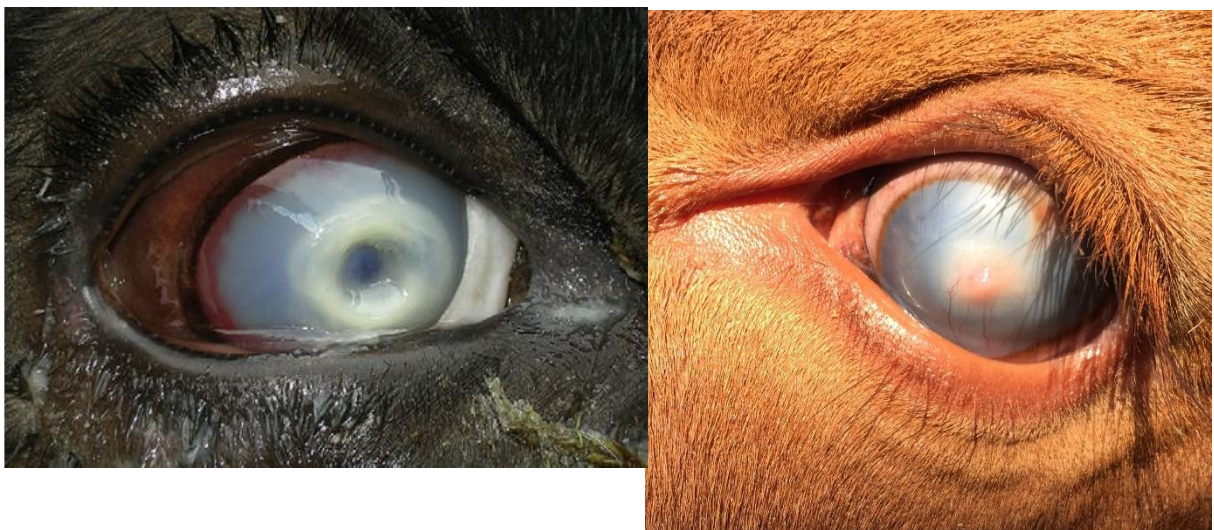
apresentava QIB ao qual foi medida a pressão intraocular. Na fase aguda este tinha um valor de 44 mm Hg, o que é consideravelmente elevado quando comparado com um valor normal de 18 mm Hg medido no olho não afectado. Passados dez dias e quando a doença já estava em processo de resolução, o olho afectado já apresentava um valor normal de 17 mm Hg. Esta elevação na pressão intraocular é provavelmente causada pela inflamação que se verifica no ângulo iridocorneano que causa uma ruptura no fluxo de humor aquoso.

À medida que o estroma da córnea é afectado, os subprodutos e enzimas proteolíticas inflamatórias comprometem a integridade da córnea. O animal pode perder a visão dado o edema, fotofobia e blefarospasmo. Se ocorrer perfuração, pode desenvolver-se panoftalmite e *phthisis bulbi* (atrofia do globo ocular), no entanto o que acontece mais frequentemente é o prolapso da úvea e a cobertura da lesão com fibrina, mantendo-se a forma do globo ocular (Brown et al., 1998). Ao contrário de outras espécies, os bovinos podem recuperar total ou

parcialmente a visão depois de uma ruptura de córnea, ilustrada na Figura 6 (Miller & Fales, 1984). Passados dois dias do aparecimento da úlcera, o processo de cicatrização pode começar com neovascularização da córnea (Brown et al., 1998). A extensão e profundidade da vascularização depende da idade da lesão e do envolvimento da córnea (Crispin, 2005). A vascularização começa no bordo periférico do olho e rapidamente converge para a lesão primária central. Quando os vasos chegam à zona ulcerada, a opacidade começa a desvanecer, começando na periferia e no sentido do centro da lesão, como mostra a Figura 7 (Gelatt et al., 2013). Os vasos superficiais são vermelhos vivo, com ramificações e têm origem no limbo e podem estender-se para a córnea axial. Também pode haver formação de tecido de granulação no local da úlcera, dependendo do grau de envolvimento do estroma (Brown et al., 1998).

Figura 6 - Uma úlcera de córnea profunda que afecta o estroma. Pode-se observar edema difuso da córnea com vascularização desde o limbo em direcção ao centro da lesão. Fonte: Alexander, 2010.

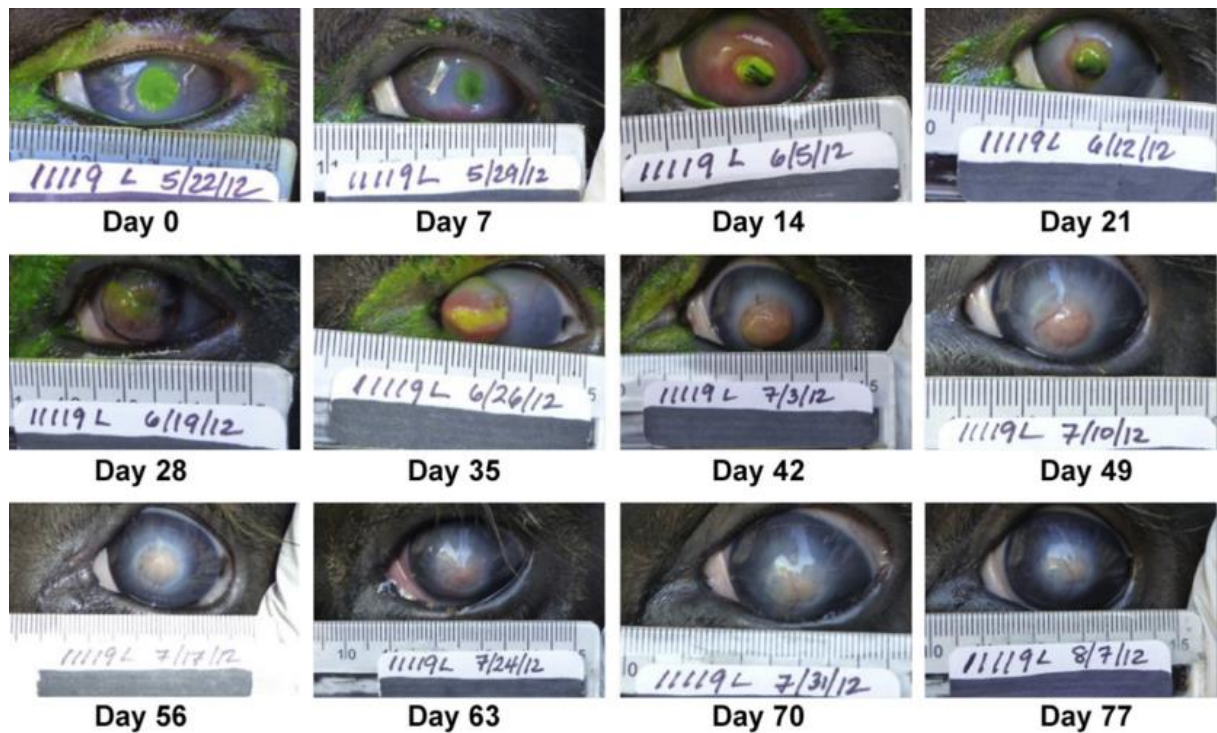
Figura 7 - Lesão de QIB em resolução. Pormenor da vascularização que atingiu o centro da lesão. Original



O tempo de recuperação é variável e depende muito da extensão das lesões, sendo normal que os animais mais jovens tenham uma recuperação mais lenta (Crispin, 2005). Segundo Radostists (2007) a recuperação completa ocorre passadas 3 a 5 semanas do início da doença. Em casos de QIB moderada, com apenas envolvimento da córnea superficial, as opacidades podem desaparecer completamente entre 2 a 4 semanas (Brown et al., 1998). Em casos mais graves, os animais podem não recuperar totalmente e permanecer uma opacidade na córnea que, normalmente, é axial e densa, como é o caso de quando há envolvimento do estroma da córnea e ulceração mais grave. Mesmo esta opacidade que não desaparece durante o intervalo de tempo normal de recuperação, pode vir a desaparecer gradualmente. Um globo ocular que tenha rupturado pode cegar permanentemente e ficar

desfigurado, como é o caso ilustrado na Figura 8 (Stokka et al., 2000; Crispin, 2005). Após a recuperação das lesões, há animais que podem tornar-se portadores do agente e que não mostram sinais clínicos, ou têm alguns episódios pontuais de lacrimejamento (Crispin, 2005).

Figura 8 - Evolução de uma úlcera perforada num vitelo que sofria de QIB. As fotografias mostram um período de tempo de 77 dias, desde o primeiro dia em que a úlcera foi detectada. Embora a lesão tenha cicatrizado, o animal ficou permanentemente cego no olho afectado. Fonte: Angelos, 2015.



2.7 Diagnóstico

2.7.1 Diagnóstico clínico

A QIB pode ser facilmente confundida com outras doenças que, normalmente, são processos traumáticos ou infecciosos.

Em primeiro lugar deve-se excluir a presença de corpos estranhos, com uma observação cuidada do olho do animal em causa. É necessária a contenção do mesmo de maneira que a posição da sua cabeça permita uma examinação de perto. É importante descartar a presença de um corpo estranho, pois muitas vezes estes produzem sinais clínicos iniciais semelhantes à QIB. Quando não é visível nenhum corpo estranho no olho, é importante a utilização do teste de fluoresceína, pois o padrão de corante é característico, como mostra a Figura 9 (Angelos, 2015). Uma agressão traumática também pode ser diagnosticada pois, usualmente, há a evidência de uma lesão física e estes casos são normalmente isolados em apenas um dos olhos do animal. Quando se trata de um caso de QIB, normalmente vários animais são atingidos na mesma altura e, por vezes, são afectados os dois olhos de um animal (Radostists, 2007).

No que às doenças infecciosas diz respeito, deve-se ter em conta que existem outros agentes capazes de produzir lesões semelhantes à QIB.

Animais com rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) também se apresentam com uma grande descarga ocular, mas esta é acompanhada de uma descarga nasal e congestão do espelho, com lesões erosivas na mucosa nasal e bucal. Esta doença também pode produzir sinais sistémicos e não há ulceração da córnea (Turquieto, Chayer, Jorge, & Passucci, 2008). A confirmação do diagnóstico pode ser feita por serologia (Alexander, 2010) ou diagnóstico do agente.

A diarreia viral bovina (BVD) pode dar origem a uma opacidade da córnea que, geralmente, é unilateral e transitória. O quadro diarreico e as lesões do aparelho digestivo permitem a diferenciação (Turquieto et al., 2008).

A febre catarral maligna é uma doença aguda e generalizada, causada por um herpesvirus, que dá origem a hipertermia, opacidade da córnea, rinorreia abundante e por vezes sinais neurológicos. Pode ser distinguida de QIB pela necrose difusa das mucosas nasal e bucal e linfadenite (Turquieto et al., 2008).

Existem também vários agentes infecciosos bacterianos que podem dar origem a sinais clínicos semelhantes a QIB. Bactérias como *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis*, *Listeria monocytogenes* e *Chlamydophila sp.* já foram isoladas de animais com conjuntivites que apresentavam sinais clínicos semelhantes a QIB. O diagnóstico diferencial é efectuado através da colheita de amostra com zaragatoa e isolamento do agente (Radostists, 2007).

Figura 9 - Olho após a aplicação de fluoresceína. Note-se o padrão do corante em que a área de fluoresceína no olho é contínua com outra área corada na junção esclero-corneana. Este padrão é característico de úlceras associadas a corpos estranhos. Fonte: Angelos, 2015.



2.7.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico é realizado com base nos sinais clínicos e na confirmação em laboratório. Deve-se ter sempre em conta que os surtos desta doença são mais comuns em certas épocas do ano e que é mais comum em animais jovens. Mesmo que o diagnóstico clínico esteja certo, o envio de material para laboratório é fundamental. Só assim é possível conhecer a estirpe em causa e a sua sensibilidade a antibióticos (Turquieto et al., 2008).

A recolha de amostras para cultura microbiológica deve ser feita sempre antes de qualquer tratamento tópico no olho (Alexander, 2010). Na recolha da amostra é recomendável que as pálpebras estejam bem abertas de maneira a evitar contaminantes. Em seguida utiliza-se uma zaragatoa estéril e faz-se a recolha no fundo de saco ventral das secreções lacrimais. A zaragatoa deve ser logo colocada num meio adequado que permita a viabilidade de *M. bovis*. Esta bactéria encontra-se em maiores concentrações em animais que estão no início da doença, na fase de epífora, pelo que é aconselhável recolher várias amostras quando existem vários animais afectados (Turquieto et al., 2008). Após a recolha da zaragatoa, é efectuada uma cultura para isolamento do microorganismo ou identificação por PCR (Radostists, 2007; Alexander, 2010).

As aglutininas séricas estão presentes durante duas a três semanas após o início dos sinais clínicos e um teste de precipitina por difusão em gel também é capaz de detectar anticorpos contra *M. bovis*. Também se pode utilizar um teste de ELISA para a detecção de anticorpos em estudos experimentais. No entanto, nem os títulos de anticorpos aglutinantes nem os de anticorpos detectados por ELISA se correlacionam bem com a resistência individual do animal à infecção. Apesar de termos estes testes disponíveis, na prática clínica existem poucas indicações que justifiquem a utilização dos mesmos (Radostists, 2007).

2.8 Tratamento

A QIB é frequentemente uma doença autolimitante. A recuperação pode ocorrer sem tratamento, no entanto, quando este é efectuado atempadamente, reduz significativamente a incidência de cicatrizes (Radostists, 2007) e perda de visão.

A investigação sobre a QIB levada a cabo nos últimos 60 anos mostrou que existe uma grande variedade de antibióticos administrados por via intramuscular (IM), subcutânea (SC), subconjuntival e tópica que são eficazes no tratamento da doença. No entanto, alguns destes estudos não têm a aleatoriedade e os controlos adequados (Angelos, 2015). Muitas vezes a via de administração é escolhida com base na facilidade de administração e no custo do tratamento (Radostists, 2007).

Apesar de a terapia antimicrobiana ser a de eleição no tratamento de QIB, nenhum protocolo assegura o sucesso total. Esta pode não erradicar o estado de portador do animal ou até não melhorar o estado clínico. Manter uma concentração terapêutica adequada no filme lacrimal é muitas vezes difícil por causa de considerações económicas e práticas (Brown et al., 1998).

2.8.1 Tratamento tópico

Casos recentes e agudos de QIB respondem bastante bem ao tratamento com pomadas e soluções oftálmicas que contêm antibióticos, mas precisam de ser administrados no saco conjuntival frequentemente, o que pode não ser prático em condições de campo (Radostists, 2007; Alexander, 2010). Atropina tópica (1%) pode ser utilizada pois induz midríase que pode aliviar algum do desconforto, ao contrariar o espasmo do corpo ciliar. No entanto, este efeito midriático é bastante variável e pode conduzir a danos oculares se os animais não tiverem protecção contra a radiação solar (Alexander, 2010). Esta bactéria é sensível à maior parte dos antibióticos e sulfonamidas, mas mostra resistência à eritromicina, lincomicina e tilosina (Radostists, 2007). Alguns dos antibióticos mais utilizados topicamente são a cloxacilina (Alexander, 2010; Angelos, 2015), a penicilina (Angelos, 2015) e a oxitetraciclina. No entanto, num estudo conduzido por Maboni et al. (2015) conclui-se que 20% das estirpes de *M. bovis* eram resistentes a oxitetraciclina, talvez pelo seu uso indiscriminado ao longo dos anos.

No estudo de Simões (2008) foi testado um tratamento tópico alternativo que consistia na aplicação de uma solução a 10% de penicilina G procaína através de nebulização, com o auxílio de um borrifador, uma vez ao dia durante três dias. Os resultados mostraram que este tratamento teve efeitos benéficos na evolução da sintomatologia, mais notórios em casos iniciais da doença. Este método tem a vantagem de ser de fácil aplicação, não exigindo uma contenção rigorosa do animal.

2.8.2 Tratamento subconjuntival

As administrações subconjuntivais são uma maneira relativamente barata de administrar antibióticos. Estas também são eficazes no tratamento de QIB quando existe uma extensa vascularização da córnea (Radostists, 2007). Apesar disso, há vários riscos associados a esta via de administração, sobretudo quando se tem em conta o animal doente e pouco habituado a manipulação (Alexander, 2010). A penicilina é um antibiótico bastante utilizado por esta via de administração, sendo demonstrada a sua eficácia por vários estudos (Angelos, 2015).

Também a oxitetraciclina é utilizada no tratamento subconjuntival. Este antibiótico parece ser irritante para os tecidos da pálpebra superior e pode ocorrer edema da mesma, como mostra a Figura 10. Apesar de parecer uma contrariedade este facto pode não o ser, pois a capacidade de o animal abrir a pálpebra superior está limitada, conferindo protecção à córnea (Alexander, 2010). Não obstante, o processo inflamatório que é criado causa dor ao animal, o que pode ser uma contra-indicação. Os antibióticos mais utilizados por esta via são os dois já anteriormente mencionados. No entanto, outros estudos mostraram que também a clindamicina (Senturk et al., 2007) e a marbofloxacin são eficazes no tratamento de QIB (Alexander, 2010).

Figura 10 - Edema como consequência de uma administração subconjuntival de oxitetraciclina. Fonte: Stilwell, 2016.



2.8.3 Tratamento sistémico

O tratamento sistémico pode ser uma boa alternativa aos tratamentos tópico ou subconjuntival. A sua principal vantagem é de ser precisa menos contenção na sua administração, tornando-se assim mais segura para o animal e clínico. No entanto, este pode ser mais caro dada a quantidade de fármaco utilizada. Neste modelo de tratamento podemos associar ao antimicrobiano um anti-inflamatório não-esteróide (AINE).. Comparando com as duas vias de administração discutidas acima, esta torna-se mais rápida e segura e garante uma terapia mais prolongada (Alexander, 2010).

Existem vários antibióticos que podem ser utilizados, tais como oxitetraciclina, florfenicol, tilmicosina, ceftiofur e tulatromicina (Alexander, 2010; Angelos, 2015) e penicilina. Talvez dado à sua grande divulgação e custo relativamente baixo a oxitetraciclina seja o mais utilizado. Apesar de todos estes fármacos terem estudos que mostram a sua efectividade no

tratamento de QIB, outros estudos comparativos demonstram que alguns podem funcionar melhor que outros. Um estudo realizado em 30 animais de raça Parda Suíça comparou a acção de florfenicol e oxitetraciclina, concluindo que o primeiro fármaco era mais efectivo no tratamento da doença (Angelos, 2015).

2.9 Prevenção e controlo

M. bovis é um microorganismo ubiquitário e como tal a sua eliminação torna-se praticamente impossível. Ainda mais difícil será o seu controlo em grupos de animais em sistema extensivo (Radostists, 2007).

Uma prática bastante útil na prevenção de QIB é o controlo da população de insectos que podem actuar como vectores. Estes são a principal fonte de contágio, sendo por isso muito importante o seu controlo. Os insecticidas disponíveis, como por exemplo a deltametrina, não controlam completamente as moscas, no entanto diminuem significativamente a sua quantidade reduzindo a incidência de infecções por *M. bovis*. Este controlo deve começar nas estações de tempo mais quente e prolongar-se durante as mesmas (Brown et al., 1998; Turqueto et al., 2008; Alexander, 2010).

Também a cuidada vigilância dos animais é de extrema importância, pois permite a observação dos primeiros sinais clínicos e o consequente tratamento. Se possível, os animais afectados devem ser isolados e ficar sob vigilância (Radostists, 2007). As práticas de manejo também se devem considerar para diminuir a exposição dos animais a factores de risco. Em caso de possibilidade, é de evitar que os animais pastem em locais com vegetação que possa provocar lesões oculares e a alimentação com feno que contenham pragas. É também importante que disponham de sombras de maneira a reduzir a sua exposição à radiação ultravioleta (Turqueto et al., 2008). Como existem outras doenças que podem predispor ao aparecimento de QIB, como o IBR, é essencial o controlo das mesmas.

Nos últimos anos têm havido esforços consideráveis no desenvolvimento de métodos de imunoprofilaxia. No entanto, os resultados obtidos com várias vacinas têm sido inconsistentes (Radostists, 2007). Tal se deve ao facto de existir uma grande variedade de estirpes de *M. bovis*, sendo o grande obstáculo desta medida profiláctica (Turqueto et al., 2008). Sendo assim, a utilização de vacinas autógenas seria uma opção a considerar na prevenção desta doença.

3 Conceito de vacina e vacina autógena

3.1 Vacina

A vacinação é, de longe, o método mais eficiente e efectivo no controlo de doenças infecciosas em humanos e animais. De facto, a erradicação de várias doenças como a varíola e a peste bovina e o controlo de outras como a febre aftosa, esgana, raiva e influenza não seria possível sem a utilização de vacinas. A tecnologia relativa a imunização activa continua a evoluir, com a utilização de técnicas moleculares bastante avançadas e com o crescente conhecimento dos mecanismos imunitários e as maneiras de otimizar a resposta imunitária (Tizard, 2013). Ao contrário do que tradicionalmente se refere, a história das vacinas não começou com a primeira vacinação, quando Edward Jenner usou material de pústulas de varíola bovina para proteger humanos contra varíola. Existe evidência que os Chineses praticavam a inoculação do vírus da varíola – ou variolação, como era chamado a este processo – por volta do século X. Também foi praticada em África e na Turquia antes de se estender à Europa e América (Angelos, 2010; Philadelphia T. c., 2016). No entanto, é com Edward Jenner que se dão os primeiros passos na produção de uma vacina. Este médico britânico investigou uma crença entre os camponeses que os trabalhadores que lidavam com vacas doentes com varíola bovina e que desenvolviam pústulas semelhantes às dos animais (uma doença benigna conhecida por *vaccinia*) não eram contagiados pela varíola humana. Jenner inoculou um rapaz que nunca tinha sofrido de varíola ou *vaccinia* com pús de uma lesão de varíola bovina. Este teve uma sintomatologia benigna e, posteriormente, foi inoculado com o vírus da varíola humana, mas não desenvolveu a doença. Jenner começou então a inocular muitos dos seus pacientes e o mesmo fizeram outros médicos da altura por toda a Europa (Gomes, 2016). Este método foi aperfeiçoado ao longo de muitos anos e resultando na erradicação da varíola em todo o Mundo (Philadelphia T. c., 2016).

É só com Louis Pasteur e Robert Koch que se estabelece uma relação de causa-efeito entre a presença de certos microorganismos e doenças que hoje sabemos serem causadas por esses microorganismos. É então que este cientista francês, por volta de 1885, desenvolve a vacina contra a raiva (Gomes, 2016).

Desde Jenner que a vacinação em massa permitiu controlar mais de uma dezena de doenças infecciosas que afectam os humanos. Apesar de não serem muito sofisticadas, as vacinas anteriores à 2ª Guerra Mundial foram suficientemente eficazes para reduzir drasticamente a morbidade e mortalidade causadas por inúmeras doenças (Gomes, 2016). A evolução científica que se deu depois da 2ª Guerra Mundial, permitiu um grande avanço na pesquisa e desenvolvimento de vacinas. Os novos métodos de crescimento de vírus em laboratório conduziram a rápidas descobertas e inovações, como o caso das vacinas para a poliomielite, sarampo, parotidite e rubéola. Com este avanço, foi possível reduzir significativamente o impacto que estas doenças tinham na população humana (Philadelphia T. c., 2016).

3.1.1 Tipos de imunização artificiais

Existem dois métodos básicos pelos quais um animal pode ficar imune a uma doença infecciosa: a imunização passiva e activa. A primeira produz uma imunidade temporária pela transferência de anticorpos de um animal resistente para um animal susceptível. No caso da imunidade activa, esta é garantida pela administração de antígenos de forma a desencadear uma resposta imunitária. Enquanto a primeira confere imunidade imediata mas não permanece por muito tempo, a segunda pode demorar algum tempo a ser estabelecida mas é conferida por um período de tempo longo (Tizard, 2013).

3.1.1.1 Imunização Passiva

Este tipo de imunização necessita que os anticorpos sejam produzidos por um animal dador por imunização activa e que estes sejam administrados a animais susceptíveis para que confirmem protecção imediata. Um soro que contenha estes anticorpos (anti-soro) pode ser produzido contra uma grande variedade de agentes patogénios. Estes soros podem ser bastante eficazes na protecção de animais contra microorganismos toxinogénicos como por exemplo *Clostridium tetani* e *Clostridium perfringens*, usando anti-soro produzido em cavalos. As toxinas de *Clostridium* são proteínas que podem ser desnaturadas e transformadas em não-tóxicas com um tratamento de formaldeído – toxóides. Os animais dadores são injectados com toxóides para que sejam produzidos os anticorpos. Posteriormente, estes são sangrados, o plasma é separado e a fracção de globulinas que contém os anticorpos é concentrada, titulada e dispensada.

Os anticorpos monoclonais são outra das hipóteses no que à imunização passiva diz respeito. No entanto, estes são produzidos em hibridomas de ratos e são imunoglobulinas destes animais. Estes anticorpos podem ser eficazes contra antígenos de *Escherichia coli* K99 para proteger vitelos contra diarreia ou no tratamento de linfomas em cães (Tizard, 2013).

3.1.1.2 Imunização Activa

A imunização activa envolve a administração de antígenos a um animal de maneira a que este responda imunologicamente e haja a produção de imunoglobulinas contra esse antígeno. Quando é reimmunizado ou exposto ao mesmo antígeno novamente, há uma segunda resposta imunitária e uma imunidade aumentada.

Este tipo de imunização tem algumas vantagens sobre a imunização passiva, tais como um período de imunidade maior, e o aumento da resposta protectora pela administração repetida do antígeno ou exposição à infecção.

As vacinas usadas na produção animal devem ser baratas, estáveis, adaptáveis à vacinação em massa e livre de efeitos adversos. Para além disso, o antígeno deve ter a capacidade de estimular as células de memória de maneira a que a imunidade conferida seja o mais prolongada possível (Tizard, 2013).

3.1.2 Classificação geral das vacinas

3.1.2.1 Vacinas inactivadas

Estas vacinas são feitas a partir de agentes bacterianos ou virais inactivados e que ficam incapazes de se multiplicar, mas que mantêm a capacidade de estimular o sistema imunitário. Também podem ser constituídas por fracções ou sub-unidades do agente em causa (partículas virais fraccionadas, toxinas naturais com actividade anulada, antigénios capsulares ou antigénios membranares).

Estas vacinas têm a vantagem (Tabela 2) de serem bastante seguras e de armazenamento mais fácil, no entanto podem requerer a toma de várias doses para induzir uma resposta imunitária satisfatória e, muitas vezes, esta tem que ser estimulada posteriormente com reforços (Gomes, 2016).

3.1.2.2 Vacinas atenuadas

Os microorganismos vivos virulentos não podem ser utilizados em vacinas, sob o risco de causarem a própria doença. A sua virulência deve ser reduzida até ao ponto em que, apesar de vivos, não possam causar doença (Tizard, 2013). O agente patogénico, obtido a partir do indivíduo infectado, é enfraquecido por meio de passagens por um hospedeiro não natural ou por um meio que não lhe seja favorável. O resultado é um agente que, quando inoculado num indivíduo, se multiplica sem causar doença, mas que induz uma resposta imunológica (Gomes, 2016).

O nível de atenuação é muito importante para o sucesso de uma vacina. Se esta for fraca, o organismo pode ser virulento e provocar doença. Se for demasiado forte o resultado pode ser uma vacina que não funcione, ou seja, não desencadeie uma resposta imunológica (Tizard, 2013).

Estas vacinas têm a vantagem (Tabela 2) de conterem um agente muito próximo do natural e de serem de fácil e barata produção. Usualmente são eficazes com apenas uma administração, requerendo menos doses que as vacinas inactivadas. Contudo, existe sempre o risco que o agente atenuado reverta e cause doença (Tizard, 2013).

Tabela 2 – Comparação das vantagens entre vacinas inactivadas e atenuadas. Fonte: (Tizard, 2013).

Vantagens das vacinas inactivadas e atenuadas	
Inactivadas:	Atenuadas:
<ul style="list-style-type: none"> • Estáveis e de fácil armazenamento; • Probabilidade baixa de causar doença; • Não há o risco de reversão; • Seguras em pacientes imunodeficientes; • Custos de produção baixos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requer menos doses; • Não são necessários adjuvantes; • Menos provável haver hipersensibilidade; • Relativamente baratas; • Doses mais pequenas; • Estimula uma resposta imunitária humoral e celular; • Protecção prolongada.

3.1.2.3 Vacinas recombinadas geneticamente

Embora as vacinas inactivadas e atenuadas tenham tido bastante sucesso no controlo e erradicação de numerosas doenças infecciosas, os cientistas estão sempre à procura de uma maneira mais efectiva, simples, barata e segura de produzir vacinas (Tizard, 2013). Estas são produzidas por recombinação genética, a partir de modernas técnicas de biologia molecular e engenharia genética (Gomes, 2016). Estas novas técnicas incluem vacinas vivas recombinantes e vacinas de ADN.

As vacinas vivas recombinantes utilizam vírus atenuados (ou estirpes bacterianas) como vectores. Basicamente, é utilizado um vírus ou bactéria agente de uma doença como veículo de transporte de uma proteína imunogénica de outro agente infeccioso. Em certos casos este método ajuda a aumentar a resposta imunitária. Contudo, há casos em que este procedimento é utilizado porque a administração do agente como vacina causaria doença no indivíduo. Em primeiro lugar, é identificada uma parte do ADN viral ou bacteriano que não seja necessária para a sua replicação. Um ou mais genes que codifiquem imunogénios (qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunológica) de outros agentes infecciosos são inseridos nessa região. Quando o vírus ou bactéria modificados são administrados a um indivíduo, o imunogénio é expresso e apresentado, gerando uma resposta imunitária contra o imunogénio em causa e, consequentemente, contra o agente do qual tem origem. O primeiro vírus a ser utilizado nesta técnica foi o *Vaccinia*, que foi projectado para conferir protecção contra gripe, raiva, hepatite B entre outras doenças (Philadelphia T. C., 2016).

As vacinas de ADN consistem em cadeias de ADN que codificam um antigénio em particular, que são administradas directamente no músculo. O próprio ADN vai ser inserido nas células do indivíduo que produz o antigénio do agente infeccioso em causa. O antigénio é reconhecido como *non-self* e é desencadeada uma resposta imunitária. Este tipo de vacina tem o benefício

de ser relativamente fácil de produzir, mas ainda se encontra numa fase experimental. Ainda nenhuma vacina de ADN foi capaz de produzir uma resposta imunitária suficientemente forte para prevenir uma posterior infecção. No entanto, os cientistas acreditam que este tipo de vacinas pode vir a garantir imunidade contra doenças parasitárias, como por exemplo a malária (Philadelphia T. C., 2016).

3.1.3 Novos métodos de apresentação

Quando se pensa em vacinação associa-se logo a sua administração a um médico veterinário. No entanto, o futuro da imunização passará por outros métodos de apresentação que podem ser bem diferentes daqueles utilizados hoje em dia.

As vacinas administradas por via nasal já são utilizadas em algumas situações, como é o caso do vírus da parainfluenza tipo 3, do vírus respiratório sincicial bovino e do vírus do IBR. Outra via de administração alternativa inclui a aplicação de um emplastro que contenha a vacina. Este método de aplicação pode ser bastante útil em áreas remotas, pois não é necessário pessoal médico qualificado para a sua administração.

Outro dos problemas que existe actualmente é o da temperatura de armazenamento necessária para que as vacinas não percam a viabilidade. Muitas vacinas requerem temperaturas de refrigeração para o seu armazenamento, algo que é praticamente impossível em várias partes do Mundo onde a vacinação é uma peça fundamental do controlo de doenças infecciosas. A pesquisa científica segue no sentido da descoberta de vacinas que não necessitem de temperaturas de refrigeração durante o armazenamento.

O futuro da imunização depende da pesquisa de vacinas que sejam mais fáceis de administrar, não precisem de refrigeração durante o armazenamento e que proporcionem uma resposta imunitária longa (Philadelphia T. C., 2016).

3.2 Vacinas autógenas

As vacinas autógenas foram introduzidas na medicina humana há mais de 100 anos atrás. O bacteriologista e imunologista *Sir* Almroth Wright foi o impulsionador da utilização deste tipo de vacina, usando-a no tratamento e prevenção de vários tipos de infecções crónicas e recorrentes (Nolte, 2009). Os seus primeiros pacientes foram indivíduos que apresentavam abscessos cutâneos recorrentes e que o procuraram para serem vacinados como ele tinha feito com a vacina que utilizava contra a febre tifóide. Wright isolou os estafilococos de cada paciente e preparou uma “vacina morta pelo calor”. Foram administradas várias doses de vacina aos seus pacientes e estes ficaram curados (Smith, 1970).

A seguir aos trabalhos de Wright deu-se um grande aumento no uso de vacinas autógenas em Inglaterra e nos Estados Unidos da América, no tratamento de abscessos cutâneos e outras infecções crónicas. Entre 1910 e 1921, Sicard, Rackemann e Thomas foram outros

alergologistas que utilizaram este tipo de vacinas para o tratamento de pacientes com asma com sucesso (Smith, 1970).

Em Portugal, foi o Serviço de Produção de Imunogénios do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária que começou a produção de vacinas autógenas. Os registos mais antigos da produção de lotes deste tipo de vacinas datam do ano de 1980 (Carvalho, 2007) . Hoje em dia as vacinas autógenas são utilizadas em várias situações, sobretudo como metafilaxia. Este tipo de vacina é bastante útil na prevenção de doenças para as quais não existe vacina comercial e nos casos em que um agente patogénico tem várias estirpes não existindo imunidade cruzada entre elas ou que esta seja muito reduzida.

3.2.1 Vacinas autógenas de uso veterinário

Uma vacina autógena é definida como um produto veterinário imunológico inactivado ou não-inactivado que é produzida a partir de agentes patogénicos e antigénios obtidos de um animal ou animais doentes ou portadores e utilizada para a imunização activa de outros animais da mesma exploração (Attia, Schmerold, & Hönel, 2013).

Quando se consideram as vacinas autógenas de uso veterinário, podemos dividi-las em dois grupos: as autovacinas e as vacinas de rebanho. As primeiras são preparadas a partir de microrganismos patogénicos isolados de um animal e aplicadas nesse mesmo animal. Este tipo de vacina é mais utilizado nos animais de companhia. Por outro lado, as vacinas de rebanho são produzidas a partir de agentes patogénicos isolados de animais doentes pertencentes a um efectivo, sendo posteriormente utilizadas na mesma exploração para protecção dos coabitantes (Carvalho, 2007).

Podemos então considerar que as vacinas autógenas devem respeitar os seguintes pressupostos (Carvalho, 2007):

- Serem utilizadas como uma ferramenta de metafilaxia em explorações pecuárias, ou seja, utilizadas com o objectivo de estimular o sistema imunitário dos animais de uma determinada exploração procurando a cura dos que se encontram doentes e a protecção dos saudáveis. Estes casos normalmente dizem respeito a doenças infecciosas que não se conseguem controlar com o recurso a antimicrobianos;
- A utilização de autovacinas em animais de companhia ocorre usualmente em casos de doenças de carácter crónico causadas por agentes resistentes a antimicrobianos. Neste caso há a tentativa da estimulação do sistema imunitário do próprio animal para promover a sua recuperação;
- É indispensável um diagnóstico exacto e rigoroso para a correcta utilização deste tipo de produto, quer clínico, quer bacteriológico. É fundamental que o isolamento bacteriológico seja feito de maneira correcta para garantir que os microrganismos isolados são aqueles que, de facto, provocam a doença observada.

Com isto, podemos verificar que existe uma diferença básica entre as vacinas convencionais e as autógenas. Enquanto as primeiras são normalmente utilizadas profilaticamente, ou seja, para a prevenção de doenças, as vacinas autógenas são mais utilizadas como medida metafiláctica. No entanto, há o caso das doenças para as quais não existe vacina comercial, constituindo uma excepção. Nesta situação as vacinas de rebanho são utilizadas como profilaxia.

3.2.2 Utilização de vacinas autógenas

Como já foi referido anteriormente, este tipo de vacinas é utilizado em diferentes situações. A necessidade da produção de uma vacina autógena pode resultar de várias situações, tais como (Carvalho, 2007):

- Existência numa exploração de uma doença infecciosa não controlável por antibioterapia;
- Existência de uma doença crónica, que não se consegue controlar com o recurso a antibióticos;
- Surgimento de uma doença nova para a qual não existe uma vacina comercial disponível;
- Surgimento de novas estirpes ou serótipos de espécies de microrganismos que não apresentam imunidade cruzada e/ou não estão presentes nas vacinas comerciais disponíveis.;
- Doenças que afectam espécies animais “menores” para as quais não existam vacinas comerciais. Na União Europeia, são consideradas espécies “maiores” aquelas que os efectivos têm maior expressão: bovinos, ovinos, suínos, galinhas, salmonídeos, cães e gatos. Sendo assim, todas as outras espécies que não pertençam a este grupo são consideradas “menores”;
- Doenças que sejam indicações “menores” nas espécies “maiores” para as quais não existam vacinas comerciais. Na União Europeia, é designada indicação “menor” qualquer doença pouco comum que afecte qualquer uma das espécies “maiores”.

3.2.3 Recolha de amostras e produção de uma vacina de rebanho

A recolha de amostras para o isolamento de agentes infecciosos é um passo muito importante na produção de uma vacina de rebanho. Esta deve ser feita pelo médico veterinário e deve respeitar as seguintes indicações:

- Ser realizada do local onde possam estar instalados os agentes que se pretendem identificar. No caso de *M. bovis*, devem ser feitas zaragatoas da conjuntiva ocular ou da zona ulcerada da córnea de animais afectados;

- Ser feita antes de qualquer tipo de tratamento, ou, após o intervalo de segurança de um antibiótico, se tiver sido utilizado;
- Utilizar material estéril de recolha e envio;
- Envio em refrigeração e através de um serviço rápido;
- A identificação das amostras é muito importante e estas devem ser acompanhadas de uma requisição. Esta deverá conter as informações do médico veterinário, os dados do produtor e exploração, a descrição dos sinais clínicos e suspeita e o número de doses de vacina pretendida.

De uma forma muito sucinta a produção de uma vacina de rebanho pode ser resumida nos passos seguintes. Em primeiro lugar, é feita a recolha de amostras por parte do médico veterinário e como já foi referido este passo é crucial. As amostras são enviadas para laboratório e é feita uma análise microbiológica com identificação dos agentes e estirpes em causa. É feito o crescimento do agente isolado, que posteriormente é inactivado. Em seguida, é formulada a vacina resultante e é feito o controle de qualidade do produto final. Finalmente é embalada a vacina e disponibilizado o lote correspondente (Medinfar Sorológico, 2016).

4 Ensaio experimental

4.1 Objectivo

O objectivo deste ensaio experimental foi avaliar a eficácia de uma vacina autógena, neste caso de “vacina de rebanho”, no controlo de QIB em dois grupos de bovinos de carne.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Explorações

O ensaio vacinal deste trabalho foi realizado em duas explorações pertencentes ao mesmo proprietário. A Exploração 1 (E_1), a Herdade da Torre do Curvo, ilustrada na figura 9, localiza-se na freguesia de Santo Aleixo, concelho de Monforte, distrito de Portalegre, sendo a sua localização geográfica em 38°55'16.0"N 7°23'10.7"W. A Exploração 2 (E_2), a Herdade de Segóvia, também ilustrada na Figura 11, localiza-se na freguesia de Caia e São Pedro, concelho de Elvas, distrito de Portalegre e a sua localização geográfica é em 38°57'45.2"N 7°06'53.8"W.

Nestas explorações o método de produção é o extensivo, sendo a maior parte dos animais de raça Alentejana. Existem, no entanto, alguns animais resultado do cruzamento de raça Limousine e Alentejana em E_1 . Apesar de serem animais que nasceram em extensivo, no decorrer deste estudo estes estavam confinados a pequenos parques de recria, podendo-se considerar que passaram para um sistema produção intensivo.

Ambas as explorações tinham registado um número crescente de casos de QIB ao longo dos dois últimos anos (2014 e 2015), sobretudo nos meses de Verão e afectando os animais mais jovens. Em 2015 foram enviadas várias amostras para o Laboratório Sorológico, o qual realizou duas análises. Destas análises apenas foi identificada a espécie *M. bovis*. Como este laboratório não faz tipificação, ou seja, identificação de serotipos, foram identificadas apenas visualmente dois tipos de *M. bovis*. A vacina de rebanho final foi realizada a partir destes dois isolados.

É neste âmbito que surgiu a oportunidade de realizar este estudo e verificar a efectividade de uma vacina autógena de rebanho contra *M. bovis*.

Figura 11 - Fotografia de satélite onde se podem observar os locais onde foi efectuado o estudo. A exploração E1 encontra-se do lado esquerdo e a exploração E2 encontra-se do lado direito. Adaptado de <https://www.google.pt/maps>.



4.2.2 Amostra e data do estudo

Os animais presentes neste estudo eram vitelos desmamados com uma idade compreendida entre os 5 e os 8 meses, à data do início do estudo. Estes animais viviam num sistema de produção extensivo até ao desmame. Na altura do estudo estavam agrupados e mantidos em parques de recria. Fizeram parte do ensaio 126 animais, estando 69 dos mesmos em E₁ e os restantes 57 em E₂. Em E₂ todos os animais eram de raça Alentejana, enquanto que em E₁ existiam 33 animais de raça Alentejana e os restantes 24 eram animais que resultavam do cruzamento das raças Alentejana e Limousine.

O estudo decorreu entre os meses de Maio e Setembro de 2016. Os animais foram vacinados no mês de Abril de 2016. A primovacinação consistiu na administração de uma dose subcutânea de 5 mL de vacina uma primeira vez e o posterior *rappel* realizado entre 21 a 26 dias depois. A inspecção dos animais foi feita pelo autor de mês a mês durante o período do estudo. Esta inspecção consistiu na observação dos animais individualmente, sendo procurados sinais clínicos como epífora, blefarospasmo, edema da conjuntiva e vascularização da córnea, característicos da doença. Para além da busca destes indicadores da doença, os olhos de cada animal foram observados individualmente para o despiste de lesões. Quando se suspeitava de lesão compatível com *M. bovis*, o animal era tratado com tulfatromicina (Draxxin®, Zoetis) na dose de 2,5 mg/kg de peso corporal. Apesar de praticamente todos os animais suspeitos terem sido tratados, a decisão do tratamento coube sempre ao veterinário assistente. A classificação das lesões não foi efectuada, uma vez que o autor não esteve presente na identificação de todos os casos de QIB, no entanto, todas as lesões foram observadas pelo autor e/ou o veterinário assistente, que as avaliaram em termos de gravidade, presença e extensão de úlceras, lesão inicial quando detectada, evolução da doença e sequelas.

No entanto, estes animais eram observados com bastante frequência pelos tratadores (várias vezes por semana), uma vez que o maneio assim o impunha. Estes, apesar de não possuírem nenhum conhecimento sobre a doença, já estavam familiarizados com os sinais clínicos da mesma, dado o historial das explorações. Os sinais para os quais estavam alerta eram sobretudo a epífora, o blefarospasmo e o edema da conjuntiva. Quando era detectado algum destes sinais, alertavam o veterinário assistente que consoante o quadro clínico decidia fazer o tratamento para QIB ou não.

De referir que tanto o autor como tratadores estavam cegos no que à administração da vacina dizia respeito, uma vez que quando estavam perante um animal não sabiam se este tinha sido vacinado ou não.

Apesar de em ambas as explorações, existirem mangas perto dos parques onde os vitelos se encontravam, as inspecções aos animais foram feitas quando outra acção de maneio era necessária, normalmente pesagens. Desta forma conseguiu-se diminuir o número de passagens à manga, sempre causa de stress. No entanto, quando era necessário fazer-se algum tratamento este era efectuado na mesma manga.

Para a realização do estudo, os animais em cada exploração foram divididos em dois grupos. Um grupo de animais vacinados, aos quais foi administrada a vacina de rebanho, e outro grupo de animais que seria de controlo, aos quais não foi administrado qualquer tratamento. Como se tratavam de explorações comerciais, foi decidido que a proporção de animais vacinados para controlo seria cerca de 2:1, ou seja, em cada três animais dois eram vacinados e um era controlo. Assim, em E₁ existiam 45 animais vacinados e 24 animais controlo e em E₂ existiam 36 animais vacinados e 21 animais controlo. Para a determinação do grupo para cada animal, foi feito o sorteio prévio a cada vacinação com recurso às listagens dos animais de cada exploração.

4.2.3 Métodos estatísticos

A hipótese nula a testar é que não existem diferenças significativas entre os animais vacinados e controlo. Os dados foram analisados utilizando a ferramenta *EpiTools* disponível no website da Ausvet, localizado em <https://www.ausvet.com.au>. Foi realizado um teste de significância estatística para um estudo de coorte em que os dados podem ser resumidos numa tabela 2x2, consoante terem sido vacinados ou não e terem manifestado doença ou não. Como os pressupostos do teste de Qui-quadrado não eram cumpridos, o teste de hipótese realizado foi o teste exacto de Fisher.

4.3 Resultados

A avaliação estatística dos dados do estudo foi feita em separado para cada exploração e no conjunto das duas explorações.

4.3.1 Exploração 1

Como se pode verificar pela análise da Tabela 3, nesta exploração foram detectadas lesões oculares em oito animais dos 69 totais. Destes, cinco pertenciam ao grupo de animais que foi vacinado e três pertenciam ao grupo controlo. As lesões observadas foram de pouca gravidade, sendo geralmente caracterizadas por um edema ligeiro da conjuntiva e vascularização da córnea (Figura 12), não tendo sido observadas úlceras de córnea. Todas as lesões foram unilaterais. Dos oito animais, dois ficaram com uma opacidade de pequenas dimensões no olho afectado, não prejudicando significativamente a sua visão. Nenhum animal ficou cego do olho afectado.

Na Figura 13 são apresentados os novos casos de doença que foram registados em cada mês. Da análise deste gráfico é de salientar que seis dos oito casos totais foram observados no mês de Junho. Em Julho e Agosto foram identificados os outros dois casos, um em cada um desses meses. É também de notar que nos meses de Maio e Setembro não foram observados quaisquer casos de QIB nesta exploração.

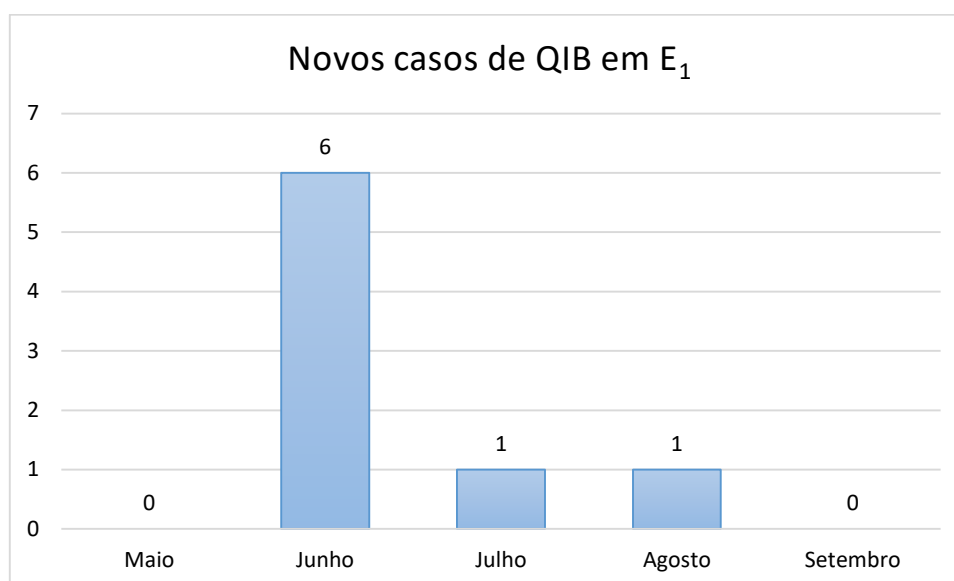
Figura 12 – Lesão de um animal presente na Exploração 1. Original.



Tabela 3 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo em E₁.

	Doença +	Doença -	Total
Vacinação +	5	40	45
Vacinação -	3	21	24
Total	8	61	69

Figura 13 - Identificação de novos casos de QIB na Exploração 1 ao longo do estudo.



Na Tabela 4 estão resumidos os resultados da análise estatística para as medidas de associação. Como se pode verificar a incidência de QIB no grupo controlo é sensivelmente superior, no entanto, os valores entre os dois grupos são muito semelhantes.

O valor de risco relativo é menor que 1, o que poderá indicar que o factor de exposição é protector. Ou seja, o risco de um animal vacinado contrair a doença será menor do que o de um animal do grupo controlo. No entanto, este valor (0,889) está muito próximo de 1 e o intervalo de confiança situa-se entre os valores de 0,232 e 3,405. Para além disso, como se verifica mais à frente pelo teste estatístico, as diferenças entre grupos não são significativas. O mesmo se passa para o *odds ratio*, sendo o valor de 0,875 também muito perto da unidade.

Tabela 4 - Resumo das medidas de associação entre os grupos vacinal e controlo para E₁.

Medidas de associação	Estimativa	Limite inferior 95%	Limite Superior 95%
Incidência geral	0,116	0,051	0,216
Incidência Vacinação +	0,111	0,037	0,241
Incidência Vacinação -	0,125	0,027	0,324
Odds Ratio	0,875	0,19	4,024
Risco Relativo	0,889	0,232	3,405

Em seguida foi efectuado o teste exacto de Fisher para testar a hipótese da associação entre a utilização da vacina de rebanho e a ocorrência de QIB. Como mostra a Tabela 5, o valor de p para este teste é superior a 0,05, ou seja, a hipótese nula é aceite. Assim, conclui-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os animais pertencentes ao grupo vacinal e ao grupo controlo.

Tabela 5 - Teste de significância para E₁.

	Valor p
Teste exacto de Fisher (2-tailed)	1

4.3.2 Exploração 2

Pela análise da Tabela 6, observa-se que na Exploração 2 foram detectadas lesões oculares em sete animais de um total de 57. Dois dos animais doentes pertenciam ao grupo vacinal e os restantes cinco pertenciam ao grupo controlo. Tal como na Exploração 1, as lesões observadas nesta exploração foram de pouca gravidade, caracterizadas por um ligeiro edema da conjuntiva e vascularização da córnea (Figura 14), sendo as lesões iniciais pouco graves. Todas as lesões foram unilaterais. Em um animal foi observada uma úlcera de córnea, de pequena extensão. Dos sete animais doentes, apenas o animal que apresentou a úlcera ficou com uma pequena opacidade da córnea. Como tal, nenhum animal afectado ficou cego. Na Figura 15 são resumidos os novos casos de doença que foram observados em cada mês. Como se observa, foram detectados três casos em cada um dos meses de Junho e de Agosto e um só no mês de Julho. Como já se tinha verificado em E₁, nos meses de Maio e Setembro não foi detectado qualquer caso de QIB.

Tabela 6 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo em E₂.

	Doença +	Doença -	Total
Vacinação +	2	34	36
Vacinação -	5	16	21
Total	7	50	57

Figura 14 – Lesão de um animal presente na Exploração 2. Original.

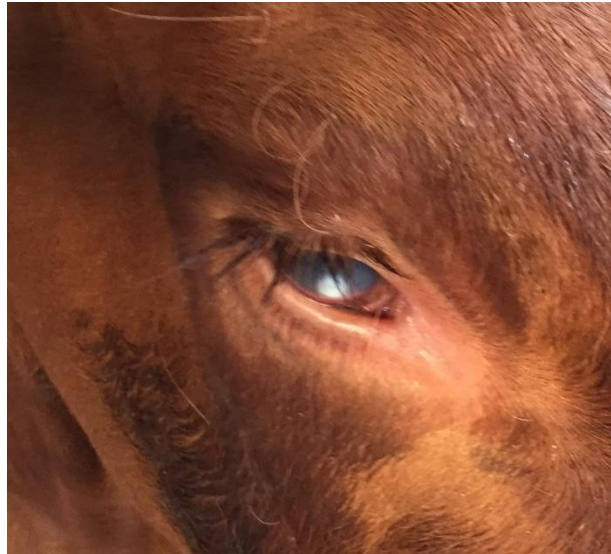
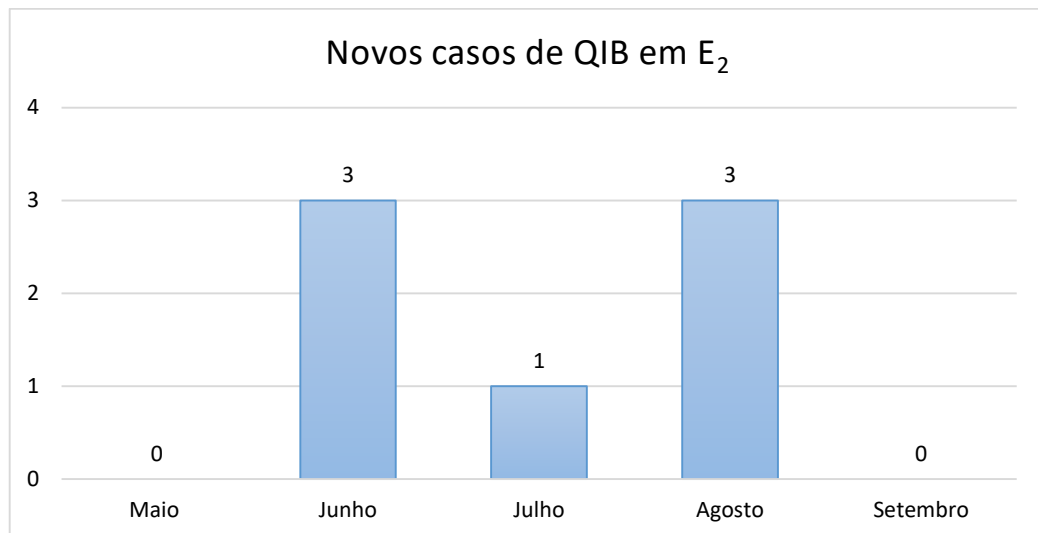


Figura 15 - Identificação de novos casos de QIB na Exploração 2 ao longo do estudo.



Os resultados da análise estatística para as medidas de associação são apresentados na Tabela 7. Ao contrário do que se verifica em E_1 , em E_2 existe uma diferença nos valores de incidência de doença nos dois grupos. A incidência no grupo controlo é de 23,8%, bastante superior ao valor de 5,6% registado no grupo vacinal.

O valor de risco relativo é de 0,233, o que significa que o factor de exposição poderá ser protector. Mais uma vez a situação verificada nesta exploração é contrária à verificada em E_1 , que apresenta um valor de risco relativo muito perto da unidade. No entanto, é importante referir que os valores de risco relativo estão entre os limites de 0,05 e 1,098 e que, como se verifica mais à frente pelo teste estatístico, as diferenças entre grupos não são significativas. O mesmo se observa para o valor de *odds ratio* (0,188) bastante abaixo da unidade.

Tabela 7 – Resumo das medidas de associação entre grupos vacinal e controlo para E₂.

Medidas de associação	Estimativa	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Incidência geral	0,123	0,051	0,237
Incidência Vacinação +	0,056	0,007	0,187
Incidência Vacinação -	0,238	0,082	0,472
Odds Ratio	0,188	0,033	1,077
Risco Relativo	0,233	0,05	1,098

Para testar a hipótese da associação entre a utilização da vacina de rebanho e a ocorrência de QIB foi utilizado o teste exacto de Fisher. Na análise da Tabela 8, observa-se que o valor de p para este teste é superior a 0,05, ou seja, aceita-se a hipótese nula. Assim, conclui-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os animais pertencentes ao grupo vacinal e ao grupo controlo.

Tabela 8 - Teste de significância para E₂.

	Valor p
Teste exacto de Fisher (2-tailed)	0,0879

4.3.3 Geral

Neste capítulo são tratados os dados das duas explorações em conjunto.

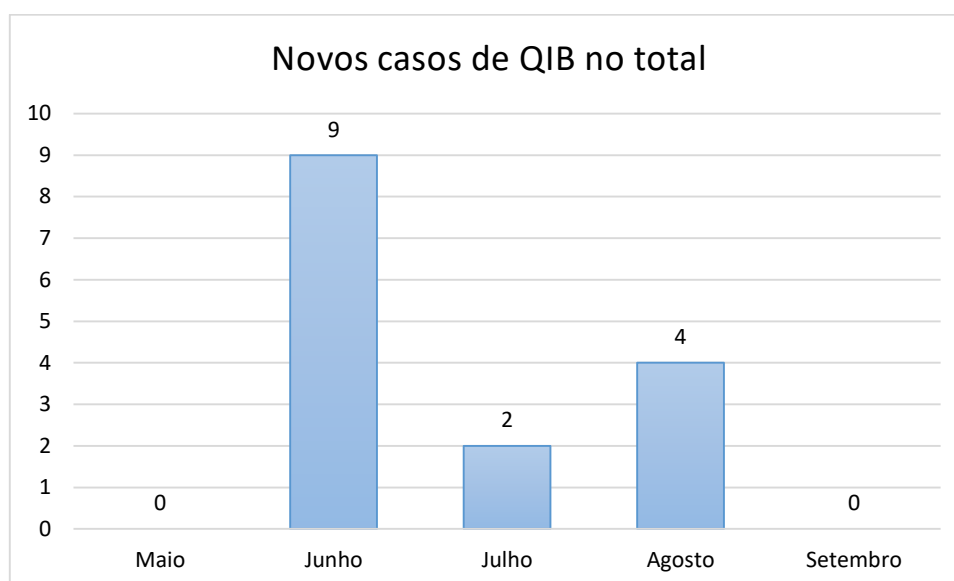
Pela análise da Tabela 9, observa-se que no total foram identificadas lesões em 15 animais num total de 126. Destes, sete animais pertenciam ao grupo vacinal e oito animais faziam parte do grupo controlo. A descrição das lesões já foi feita no capítulo correspondente a cada exploração, não sendo por isso necessário a sua repetição neste capítulo.

Na Figura 16 são resumidos os novos casos de doença registados em cada mês nas duas explorações. Analisando o gráfico, observa-se que o mês de Junho é o que regista mais casos da doença (nove), mais do dobro do que o segundo mês com mais casos, Agosto (quatro). Em Julho foram observados dois casos e nos meses de Maio e Setembro não foi registado qualquer caso.

Tabela 9 - Resumo dos animais que apresentaram lesões durante o estudo no total das duas explorações.

	Doença +	Doença -	Total
Vacinação +	7	74	81
Vacinação -	8	37	45
Total	15	111	126

Figura 16 - Identificação de novos casos de QIB no conjunto das duas explorações ao longo do estudo.



Na Tabela 10 estão resumidos os resultados da análise estatística para as medidas de associação. Existe uma diferença na incidência entre os dois grupos. O grupo vacinal tem um valor de 8,6%, enquanto o grupo controlo apresenta um valor de 17,8%, o que é sensivelmente o dobro.

O risco relativo é de 0,486, o que significa que o factor de exposição poderá ser protector. Mais uma vez, é de referir que o risco relativo se encontra entre os limites de 0,189 e 1,253 e que, como se verifica à frente pelo teste estatístico, as diferenças entre grupos não são significativas. O mesmo se verifica para o *odds ratio*, com um valor de 0,438.

Tabela 10 - Resumo das medidas de associação entre os grupos vacinal e controlo.

Medidas de associação	Estimativa	Limite inferior 95%	Limite superior 95%
Incidência geral	0,119	0,068	0,189
Incidência Vacinação +	0,086	0,035	0,17
Incidência Vacinação -	0,178	0,08	0,321
Odds Ratio	0,438	0,147	1,299
Risco Relativo	0,486	0,189	1,253

Em seguida foi efectuado o teste exacto de Fisher para testar a hipótese da associação entre a utilização da vacina de rebanho e a ocorrência de QIB. Como mostra a Tabela 11, o valor de p para este teste é superior a 0,05, ou seja, a hipótese nula é aceite. Assim, conclui-se que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os animais no grupo vacinal e no grupo controlo quando se analisam os dados das duas explorações em conjunto.

Tabela 11 - Teste de significância para os dados das duas explorações.

	Valor p
Teste exacto de Fisher (2-tailed)	0,1555

4.4 Discussão

A hipótese a testar neste estudo foi a da associação entre a utilização de uma vacina de rebanho contra QIB e o aparecimento de doença. Com os resultados que foram obtidos através da análise estatística, pode-se dizer que em ambas as explorações não foram encontradas diferenças significativas entre animais que pertenciam ao grupo vacinal e ao grupo controlo. Ao analisar os dados das duas explorações em conjunto, também se conclui que a vacina não foi eficaz na prevenção da doença.

Existem várias possibilidades para explicar o porquê da vacinação não ter funcionado na prevenção de QIB. Em primeiro lugar, há sempre a possibilidade de haver uma falha na administração da vacina, apesar de esta ter sido feita pelo autor e pelo médico veterinário assistente das explorações. Esta podia ser a explicação para um ou outro caso pontual, no entanto, não parece plausível a atribuição da não prevenção da doença pela vacina causada por falhas na administração. Outra explicação para a falha vacinal, como refere O'Connor et al. (2011), é a falha na apresentação antigénica. O insucesso da vacina na apresentação do antígeno “correcto” de *M. bovis* pode fazer com que esta seja ineficaz ou induza uma resposta imunitária não protectora. A vacina utilizada é morta e vai induzir uma resposta sistémica humoral. É esta resposta à vacinação que pode não ser protectora.

Outra das possibilidades para o fracasso da vacina é a presença de outros serotipos de *M. bovis* que não aqueles presentes na vacina. Como já foi explicado anteriormente, o grande desafio que esta bactéria impõe quando se considera a prevenção da doença que causa, é o facto de não haver imunidade cruzada entre os vários serotipos. Talvez seja este facto que contribua para não haver vacina comercial disponível em Portugal e pela vacina autógena de rebanho ser a opção lógica na tentativa de prevenção de QIB. Neste estudo não foram realizadas zaragatoas aos animais que apresentaram lesões oculares, logo não foi possível verificar a presença de novos serotipos da bactéria. Os dois serotipos presentes na vacina eram os serotipos que foram identificados nas zaragatoas efectuadas a animais com lesões no ano anterior ao estudo, sendo por isso pouco provável que existissem em circulação novos serotipos da bactéria.

A bactéria *M. bovis* é o agente etiológico geralmente implicado na QIB (Brown et al., 1998; Coetzer, 2004), no entanto, existem outros agentes associados a esta doença. São o caso de bactérias como a *M. ovis* (Angelos, 2010), *M. bovoculi* (Angelos, 2010; Gould et al., 2013), *Mycoplasma spp.* (Simões, 2008; Schnee et al., 2015) e o herpesvírus causador de IBR (Brown et al., 1998). Estes agentes são associados à QIB e já foram isolados em casos de lesões oculares em bovinos. No entanto, ainda não se conseguiu perceber qual o papel de alguns destes agentes, como é o caso de *M. ovis* (Angelos, 2010) e *M. bovoculi* (Angelos, 2010; Gould et al., 2013), na patogénese da doença. O que na realidade se observou foi que em todos os estudos experimentais em que inocularam animais com estes agentes mencionados anteriormente, em nenhum foi possível a reprodução de lesões oculares

semelhantes àsquelas observadas em casos de QIB. Apenas com a inoculação de *M. bovis* é possível reproduzir lesões características de QIB.

Como refere O'Connor et al. (2011), o desenho e metodologia que são utilizados no estudo podem afectar os resultados finais. No entanto, no estudo do presente trabalho é pouco provável que estes factores prejudiquem o resultado. A determinação do grupo a que um animal pertencia foi feita de maneira aleatória, a vacinação foi realizada antes da época em que são registados mais casos e a primovacinação consistiu na administração de duas doses de vacina espaçadas entre os 21 e 26 dias. A inspecção mensal que foi feita aos animais era realizada pelo autor, sendo os animais contidos numa manga e avaliados para a presença de lesões oculares compatíveis com QIB. Para além desta inspecção, como os animais necessitavam de várias acções de manejo por semana, eram vistos pelos tratadores, que dado o historial das explorações para a presença de QIB, estavam bastante familiarizados com as lesões oculares características desta doença, sendo capazes de identificar os animais doentes. Também poderia haver uma tendência para haver um maior escrutínio nos animais do grupo controlo e um menor escrutínio nos animais vacinados. Tal não é possível que tenha influenciado o estudo, pois quando os animais estavam a ser avaliados, quer fosse por parte do autor ou dos tratadores, não se sabia se o animal tinha sido vacinado ou não.

Para além das considerações já feitas, também se devem ter em conta outros factores que influenciem a epidemiologia da doença. Como já foi referido atrás, a QIB é influenciada por vários factores ambientais, como a temperatura, a exposição à radiação ultravioleta, a presença de vegetação que potencie lesões oculares, a presença de vectores e factores infecciosos como o IBR. Apesar das duas explorações se encontrarem geograficamente perto uma da outra e os animais em estudo se encontrarem em condições muito semelhantes, é impossível garantir que estes factores já referidos não tenham alguma influência na epidemiologia da doença. Mais difícil ainda será excluir estes factores quando estamos a falar num estudo realizado em condições de campo.

Outra possibilidade para a explicação dos resultados observados nas duas explorações é o tamanho da amostra. Na Exploração 1 observaram-se oito animais doentes, cinco deles que pertenciam ao grupo vacinal e três que pertenciam ao grupo controlo. Na Exploração 2 houve sete animais que apresentaram lesões, dois deles que pertenciam ao grupo vacinal e cinco que pertenciam ao grupo controlo. Se tivermos estes números em conta, percebe-se que se houver mais um ou dois animais a pertencer a qualquer um dos grupos pode haver uma grande influência no resultado da análise estatística e alterá-lo completamente. Tendo isto em consideração, foi feito um cálculo do tamanho da amostra para que fosse possível detectar uma diferença significativa entre duas proporções. Este cálculo foi efectuado na ferramenta *EpiTools* disponível no website da AusVet e os dados utilizados foram aqueles recolhidos na análise estatística dos dados conjuntos das duas explorações. Observa-se para os valores de incidência considerados, a proporção utilizada entre grupos de um animal controlo para dois

vacinados e um nível de confiança de 95%, o tamanho ideal da amostra para detectar uma diferença significativa entre grupos seria de 536 animais, 357 no grupo vacinal e 179 no grupo controlo. Estes valores estão bastante longe daqueles que foram observados neste estudo, sendo necessários mais de quatro vezes os animais que fizeram parte deste estudo. Apesar de estes valores serem os que se poderiam considerar como ideais para este estudo, é muitas vezes difícil, ou até talvez impossível, atingir estas condições. Ainda se torna mais difícil reunir essas condições quando se consideram estudos de campo em explorações comerciais, como é o caso desta experiência.

Para além dos resultados obtidos no que à eficácia da vacinação diz respeito, foi verificado que a distribuição dos novos casos foi particular. Em ambas as explorações, apenas foram registados casos nos meses de Junho, Julho e Agosto, não tendo sido verificado nenhum caso nos meses de Maio e Setembro. Esta distribuição pode ser explicada pela actividade do vector, uma vez que é o principal factor na transmissão da doença.

Apesar de todas estas hipóteses para explicar os resultados obtidos neste estudo, é importante que se tenham em conta os resultados obtidos em estudos prévios com um desenho semelhante.

Existem numerosos estudos que avaliam a eficácia das vacinas de *M. bovis* para prevenir a QIB em bovinos (Burns & O'Connor, 2008). No entanto, muitas vezes estes estudos não conseguem provar a eficácia da vacina na prevenção de QIB. Dois estudos realizados por Davidson & Stokka (2003) e O'Connor et al. (2011), em que também foram utilizadas vacinas autógenas em bovinos de carne, concluíram que a vacina utilizada não teve efeito na prevenção da doença. Os autores referiram hipóteses como a falha na indução de resposta imunitária, a presença de diferentes serotipos de *M. bovis* e a influência de factores ambientais como as principais razões que podem ter afectado a eficácia da vacina. Também outros dois estudos realizados por Angelos, Hess, & George (2004) e George et al. (2005) que utilizaram vacinas de *M. bovis* para prevenir QIB concluíram que a diferença registada entre grupos vacinados e grupos controlo não era significativa. No entanto, é importante referir que os autores observaram efeitos positivos na utilização da vacina. Os animais vacinados foram menos afectados, foram detectadas menos úlceras, as úlceras que apresentavam eram menores, o tempo de progressão da doença foi menor e o número de tratamentos necessários foi também menor.

Como já demonstraram os estudos anteriormente referidos, a eficácia das vacinas contra QIB é muito questionável. Tal facto também é realçado numa publicação de Burns & O'Connor (2008) em que são analisados retrospectivamente 123 ensaios vacinais. Os autores concluem que 43% dos estudos relatam um resultado favorável, no entanto, este número baixa para 20% quando apenas se tem em consideração os estudos que apontam aleatoriedade e um ensaio cego. Com base nos estudos já efectuados até à data, é seguro dizer que na maioria dos casos a vacinação contra *M. bovis* não é eficaz na prevenção de QIB.

Após todas estas considerações e hipóteses, no entanto, é importante referir a opinião do autor. Este é da opinião que a utilização deste tipo de vacina trouxe alguns efeitos positivos. Da mesma opinião partilha o médico veterinário assistente das explorações, que neste caso é o proprietário das mesmas. Também como verificaram Angelos et al. (2004) e George et al. (2005) nos seus estudos, as lesões observadas nos animais vacinados foram, no geral, de menor gravidade. Como já foi referido anteriormente, apesar de não ter sido feita a classificação de todas as lesões, estas foram observadas pelo autor e veterinário assistente, que concluíram que, em comparação com o ano anterior (Figura 17), as úlceras foram menos extensas, as lesões iniciais apresentavam menos gravidade, o tempo de resolução desde o tratamento foi menor e as sequelas foram de menor extensão, não existindo na maior parte dos casos.

Figura 17 – Lesões observadas em dois animais no ano de 2015. Original



4.5 Conclusão

A QIB é a doença ocular primária mais comum em bovinos e, apesar de em alguns casos a sua taxa de morbilidade ser baixa, em surtos mais graves pode atingir valores muito altos. A vacinação será uma opção no controlo desta doença infecciosa.

Neste estudo verificou-se que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacinal e controlo em ambas as Explorações, ou seja, a vacina não foi eficaz na prevenção de QIB. Tendo em conta estes resultados, existem vários factores que podem explicar a falta de significância destes resultados. O facto de o estudo ter sido realizado em condições de campo e o pequeno tamanho da amostra são um exemplo, sendo este último talvez o principal.

Apesar deste resultado, é a opinião do autor e do médico veterinário assistente que a vacinação contra *M. bovis* teve efeitos positivos.

Seria interessante acompanhar o desenrolar da situação nestas explorações, no que à QIB diz respeito, nos anos seguintes para melhor se poder avaliar o efeito da vacinação.

5 Bibliografia

- Alexander, D. (2010). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(3), 487–503. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.09.006>
- Angelos, J. A., Hess, J. F., & George, L. W. (2004). Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine*, 23(4), 537–545.
- Angelos, J. A. (2010). *Moraxella*. Em C. L. Gyles, J. F. Prescott, G. Songer, & C. O. Thoen, *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (4^a ed., Vol. 1, pp. 469-476). Ames, Iowa, EUA: Wiley-Blackwell.
- Angelos, J. A. (2010). *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Cause or Coincidence? *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(1), 73–78.
- Angelos, J. A. (2015). Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 31(1), 61–79.
- Attia, Y., Schmerold, I., & Hönel, A. (2013). The legal foundation of the production and use of herd-specific vaccines in Europe. *Vaccine*, 31(36), 3651–3655.
- Beard, M. K., & Moore, L. J. (1994). Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 42(1), 15-33.
- Beuk, P. (2016). *Album: Muscidae*. Obtido em 15 de Maio de 2016, de Diptera.info: http://www.diptera.info/photogallery.php?album_id=29
- Bowman, D. D. (2010). *Georgis Parasitologia Veterinária*. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier.
- Brown, M. H., Brightman, A. H., Fenwick, B. W., & Rider, M. A. (1998). Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *J Vet Intern Med*, pp. 259–266.

- Burns, M. J., & O'Connor, A. M. (2008). Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: A systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. *Vaccine*, 26(2), 144–152.
- Carvalho, R. (2007). Vacinas autógenas. *Enquadramento Regulamentar das Vacinas Autógenas de Uso Veterinário e Caracterização da sua Utilização em Portugal*, 10-13. Lisboa, Portugal.
- Coetzer, J. A. (2004). *Moraxella bovis* infection. Em J. Coetzer, *Infectious Diseases of Livestock* (Vol. 3, pp. 1487-1489). Cidade do Cabo: Oxford University Press.
- Crispin, S. (2005). *Notes on Veterinary Ophthalmology* (Vol. 1). Bristol, Reino Unido: Blackwell Publishing.
- Davidson, H. J., & Stokka, G. L. (2003). A field trial of autogenous *Moraxella bovis* bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratoconjunctivitis in a beef herd. *Canadian Veterinary Journal*, 44(7), 577–580.
- Elad, D., Yeruham, I., & Bernstein, M. (1988). *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. *Zentralbl Veterinarmed B*, 431-434.
- Farn, J. L., Strugnell, R. A., Hoyne, P. A., Michalski, W. P., & Tennent, J. M. (2001). Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6717–6720.
- Gelatt, K. N., Gilger, B. C., & Kern, T. J. (2013). *Veterinary Ophthalmology* (5ª ed., Vol. 1). Oxford, Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Gelatt, K. N., Gilger, B. C., & Kern, T. J. (2013). *Veterinary Ophthalmology* (5ª ed., Vol. 2). Oxford, Reino Unido: Wiley-lackwell.
- George, L. W., Borrowman, A. J., & Angelos, J. A. (2005). Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, 66(1), 136–142.

- Gerhardt, R. R., Allen, J. W., Greene, W. H., & Smith, P. C. (1982). The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc*, 180(2), 156–159.
- Getty, R. (1986). *Sisson/Grossman Anatomia dos animais domésticos* (5th ed., Vol. 1). Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Gloobe, H. (1989). *Anatomía aplicada del bovino*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Gomes, M. C. (2016). *Os primeiros passos: da variação a Edward Jenner*. Obtido em 10 de Abril de 2016, de Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa: <http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/vacinacao/historia/>
- Gould, S., Dewell, R., Tofflemire, K., Whitley, R. D., Millman, S. T., Opriessnig, T., ... O'Connor, A. M. (2013). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. *Veterinary Microbiology*, 164(1–2), 108–115.
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., & Rogers, D. G. (1995). Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. *Veterinary Microbiology*, 42(2-3), 183-196.
- Hoiem-Dalen, P. S., Rosenbusch, R. F., & Roth, J. A. (1990). Comparative characterization of the leukocidal and hemolytic activity of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, 51(2), 191-196.
- Hughes, D., & Pugh, G. (1970). A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. *J Am Vet Med Assoc*, 443-451.
- Jayappa, H. G., & Lehr, C. (1986). Pathogenicity and immunogenicity of pilated and nonpilated phases of *Moraxella bovis* in calves. *American Journal of Veterinary Research*, 47(10), 2217-2221.
- Kagonyera, G., L., G., & M., M. (1989). Effects of *Moraxella bovis* and culture filtrates on ⁵¹Cr-labeled bovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, 50(1), 18-21.

- Kakuda, T., Sarataphan, N., Tanaka, T., & Takai, S. (2006). Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 118(1–2), 141–147.
- Krafsur, E. S., & Moon, R. D. (1997). Bionomics of the face fly, *Musca autumnalis*. *Annual Review of Entomology*, 42(131), 503–523.
- Maboni, G., Gressler, L. T., Espindola, J. P., Schwab, M., Tasca, C., Potter, L., & Vargas, A. C. De. (2015). Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*, 549, 545–549.
- Miller, R. B., & Fales, W. H. (1984). Infectious bovine keratoconjunctivitis: an update. *The Veterinary clinics of North America. Large animal practice*, 6(3), 597-608.
- Moore, L. J., & Lepper, A. W. (1991). A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 29(1), 75-83.
- Nolte, O. (2009). *Therapeutic autogenous vaccination (homologous autovaccination) for the treatment of chronic or recurrent bacterial infections*. Obtido de Autovaccine: http://www.autovaccine.de/ND/english/autogenous_vaccines.html
- O'Connor, A. M., Brace, S., Gould, S., Dewell, R., & Engelken, T. (2011). A Randomized Clinical Trial Evaluating a Farm-of-Origin Autogenous *Moraxella bovis* Vaccine to Control Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye) in Beef Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1447–1453.
- Ostle, A. G., & Rosenbusch, R. F. (1985). Immunogenicity of *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*, 46(5), 1011-1014.
- Pedersen, K. B. (1972). Isolation and description of a haemolytic species of *Neisseria* (*N. ovis*) from cattle with infectious keratoconjunctivitis. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 135-139.
- Philadelphia, T. c. (2016). *All timelines overview*. Obtido de The History of Vaccines: <http://www.historyofvaccines.org/content/timelines/all>
- Philadelphia, T. C. (2016). *The future of immunization*. Obtido de The History of Vaccines: <http://www.historyofvaccines.org/content/articles/future-immunization>

- Postma, G. C., Carfagnini, J. C., & Minatel, L. (2008). *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Pugh, G. W., Hughes, D., & McDonald, T. J. (1968). Keratoconjunctivitis produced by *Moraxella bovis* in laboratory animals. *American Journal of Veterinary Research*, 29(10), 2057-2061.
- Radostits, O. M. (2007). Infectious Keratitis of Cattle. Em O. M. Radostits, *Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (Vol. 1, pp. 994-996). Philadelphia: Elsevier.
- Ruehl, W. W., Marrs, C. F., Fernandez, R., Falkow, S., & Schoolnik, G. K. (1988). Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *The Journal of Experimental Medicine*, 168, 983-1002.
- Schnee, C., Heller, M., Schubert, E., & Sachse, K. (2015). Point prevalence of infection with *Mycoplasma bovoculi* and *Moraxella* spp. in cattle at different stages of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Journal*, 203(1), 92–96.
- Senturk, S., Cetinf, C., Temizel, M., & Ozel, E. (2007). Evaluation of the clinical efficacy of subconjunctival injection of clindamycin in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 186–189.
- Simões, P. (2008). Ensaio experimentais - Metodologia. *Queratoconjuntivite infecciosa bovina*, 32. Lisboa.
- Smith, D. T. (1970). Autogenous Vaccines in Theory and in Practice - Personal Experience. *Archives of Internal Medicine*, 125, 344–350.
- Smith, P., & Blakenship, T. (1990). Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Am J Vet Res*, 1147-1150.
- Snowder, G. D., Vleck, L. D. Van, Cundiff, L. V, & Bennett, G. L. (2005). Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Genetic. *J.Anim.Scie*, (83), 507–518.

- Stokka, G. L., Davidson, H. J., & Van Boening, J. (Janeiro de 2000). *K-State Research and Extension Bookstore*. Obtido de K-State Research and Extension: <http://www.bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/mf2210.pdf>
- Tizard, I. R. (2013). Vaccines and their Production. Em I. R. Tizard, *Veterinary Immunology* (p. 258). Elsevier.
- Townsend, L. (2014). *Face Flies and Pinkeye*. Obtido de Entomology at the University of Kentucky: <https://entomology.ca.uky.edu/files/efpdf3/ef510.pdf>
- Turquieto, E., Chayer, R., Jorge, M. C., & Passucci, J. (Setembro de 2008). *Queratoconjuntivitis bovina actualización y análisis de casos entre 2002 y 2006 en Argentina*. Obtido de Albéitar Portal Veterinária: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3633/articulos-rumiantes-archivo/queratoconjuntivitis-bovina-actualizacion-y-analisis-de-casos-entre-2002-y-2006-en-argentina.html>
- Yu, R.-H., & Schryvers, A. B. (2002). Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 80(1), 81–90.